

반하가 천식이 유발된 생쥐 폐조직의 유전자 발현에 미치는 영향

이명진 · 김종한 · 최정화 · 박수연
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of Pinelliae Rhizoma on Gene Expression of Lung Tissue from Asthma induced Mice

Myung-Jin Lee · Jong-Han Kim · Jeong-Hwa Choi · Su-Yeon Park

Objective : This study investigated the effects of PR(Pinelliae Rhizoma) on gene expression of lung tissue resected from asthma induced mice using intra-nasal instillation.

Methods : Gene expression levels were measured using a microarray technique, and a functional analysis on these genes was conducted.

Results : A total of 3270 genes were up-regulated or down-regulated, 860 genes which were lowered by induction of asthma were restored to those of naive animals, Furthermore hand, 1235 genes were lowered to normal levels, which were elevated by induction of asthma. Most of changed genes were involved in signalling pathways. Genes in which expression levels were restored by oral administration of PR were involved in MAPK pathway, focal adhesion, and regulation of actin cytoskeleton etc. Genes of which expression levels were lowered by oral administration of PR were involved in rhodopsin-like receptor activity, zinc ion binding and ATP binding. These genes were also involved in neuroactive ligand receptor interaction, the JAK-STAT signaling pathway and also the T-cell receptor signaling pathway.

Conclusion : These results demonstrate the strong possibility that the mechanisms of PR on asthma are involved in neuroactive ligand receptor interaction pathway or related molecules.

Key words : Pinelliae Rhizoma, Asthma.

교신저자 : 김민정, 동신대학교부속목동한방병원
안이비인후피부과학교실
(Tel : 02-2640-2700, E-mail : mj0820@freechal.com)
• 접수 2008/11/07 • 수정 2008/12/04 • 채택 2008/12/05

1. 서 론

천식(asthma)은 기관지의 만성 재발성 염증질환

으로 다양한 종류의 자극에 과민 반응하여 발작성 수축을 일으키는 것을 특징으로 하며¹⁾ 이러한 증상이 저절로 혹은 치료로 호전되는 가역성 기류폐쇄를 나타내는 질환이다²⁾. 치료법은 원인 알레르겐 및 악화 인자를 회피하는 환경요법, 원인 알레르겐을 소량씩 피하주사로 반복 시행하여 원인 알레르겐에 대한 감수성을 약화시켜 증상의 호전을 유도하는 면역요법 등이 있으며 최종 단계로 스테로이드를 경구 투여하는 방법을 사용한다³⁾.

한의학에서喘息은哮喘症에 해당하는 질환으로,哮와喘은 구분할 수 있어喉中有聲響한 것을哮라 하고呼吸急促한 것을喘이라 말하나⁴⁾,哮症에는 반드시喘症이兼하여 나타난다고 하여哮喘症을 하나의證候로 보고 있다⁵⁾.哮喘의 원인으로寒冷, 心因, 痰因, 素因, 感染, 過敏性反應 및肺腎의呼吸機能障礙 등이 있으며 치료는實證은外感風寒, 痰濕內盛 등으로 나누어祛風散寒, 祛痰化濕, 宣肺平喘 등의治法으로小青龍湯, 麻杏甘石湯, 定喘湯 등의 처방을 사용하고虛證은肺虛, 心腎虛損, 上實下虛 등으로 구분하여養肺, 補益心腎, 瀉肺化痰, 補益腎元 등의治法으로生脈散, 八味丸 등 처방을 사용한다⁶⁾.

哮喘에 대응되는半夏(Pinelliae Rhizoma)는天南星科(Araceae)에 속한多年生本草인기무릇의塊莖으로痰多喘咳, 痰飲眩暈, 風痰眩暈, 痰厥頭痛, 胸脘痞悶 등의症狀을 치료한다⁷⁾.

半夏에 대한 연구로는洪⁸⁾의半夏藥鍼의기관지상피세포 TARC 분비에 관한 연구가 있으며,半夏가 사용된 처방들⁹⁻¹⁸⁾에 관해서도 많은 연구가 보고되었다. 최근에는천식과 관련하여宋¹⁹⁾의半夏가천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향에 관한 연구가 있으나천식이 유발된 생쥐 폐조직의 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 보고는 없었다.

이에 저자는 생쥐에 항원의 비강내 점적 방식으로 천식을 유발한 다음 2 주간의 반하 추출물을

투여하고, 폐조직을 적출하여 유전자 발현의 정도를 분석한 후, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

8주령된 암컷 Balb/c 생쥐를 샘타코 (서울, 한국)에서 구입하여, 일주일간 실험실환경에 적응시킨 후 온도와 습도가 조절되는 환경 (24 ± 3℃, 12-hr light-dark cycle) 에서 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하며 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재인 반하(Pinelliae Rhizoma, PR)는 전남 생약(화순, 한국)으로부터 구입하여 동신대학교 한의과대학 본초학 교실에서 정선하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Total RNA 분리를 위한 Trizol reagent (Invitrogen, Cat# 15596-026)은 진성SMR (광주, 한국)을 통하여 구입하였고, 천식 유발 및 항원 특이 항체 측정을 위한 난황 (OVA, Ovalumin, Grade V)은 Sigma (St. Louis, USA)로부터, Aluminum hydroxide (Alum, Imject Alum, Pierce)은 진텍 (광주, 한국)을 통하여 구입하였다. 기타 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)제품을 구입 사용하였다.

2. 방법

1) 약물의 준비

세척된 상태로 구입된 반하 200 g을 증류수 1,500 ml와 함께 전기약탕기(대웅, 한국)를 이용하

여 3시간 동안 전탕한 후, 거즈로 걸러 전탕액을 얻었다. 얻어진 전탕액을 5,000 Xg에서 10분간 원심분리하여 찌꺼기는 버리고 상청액을 얻은 다음 가온감압건조법으로 70℃를 유지하면서 건조 분말을 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 추출물은 16 g으로 수율은 8% 였다.

2) 천식 유발과 실험군 선정

100 μ g의 난황(OVA)을 100 μ l의 용매(PBS, phosphate buffer saline)에 녹인 다음, 3일간 생쥐에 복강주사 하여 감작(Sensitization)하였다. 2주 뒤 생쥐를 케타민 (100 mg/kg)과 림폰 (10 mg)으로 마취 시킨 후, 비강 내 점적 (Intra-nasal instillation)²⁰⁻²¹⁾의 방법으로 천식을 유발(Challenge)하였다. 비강 내 점적을 위하여 25 μ g의 난황을 30 μ l의 PBS에 녹인 다음, 하루 1회 씩 2일간 비강 내 점적을 시행하였다. 다시 3일 뒤 같은 방법으로 2번에 걸쳐 비강 내 점적을 시행하여서 총 4번의 비강 내 점적을 시행하였다. 반하 추출물의 구강 투여를 위하여 일반 고형사료에 반하 추출물을 1 g/kg 분량으로 섞어 반하식이를 제작하였으며 실험군의 생쥐로 하여금 자유로이 섭취케 하였으며, 약물의 투여기간은 총 2주였다. 정상 대조군은 실험군과 동일한 조건에서 배양된 후 천식을 유발시키고 용매(D/W, 증류수)만을 투여하였다.

3) RNA 분리

Microarray 분석을 위한 RNA 분리는 Florell 등²²⁾의 방법을 변형하여 시행되었다. 2주 간의 약물 투여가 끝난 후, 생쥐를 희생시키고 우심방을 통하여 폐조직의 관류를 시행하였다. 강제 관류가 끝난 후, PBS로 폐포 및 기관지 내부를 2번 세척한 다음 폐조직을 적출하였다. 적출된 폐조직은 다시 PBS로 2번 수세한 후, 소량의 PBS와 함께 급속 냉동 되었다. 냉동된 조직으로부터 total RNA의 분리는 Qiagen에서 제시한 절차에 따라 진행

되었다.

4) RNA 추출 정도 관리

Total RNA를 아가로스겔(Agarose gel)상에서 전기영동한 후 28S/18S RNA의 비율을 측정하여 정도 관리하여 분석 적합 판정을 확인한 후 실험을 진행하였다. Microarray 실험에 있어서 결과에 영향을 주는 여러 가지 factor들 중 가장 중요한 것이 RNA이며²³⁾, 이 RNA 상태를 확인하기 위해 Agilent사의 Bioanalyzer 2100을 사용하여 rRNA ratio (28S/18S ribosomal RNA)를 확인함으로써 판정하였다.

5) DNA 칩을 이용한 실험

45K oligo-chip²⁴⁾을 이용하여 실험을 수행하였다. 탐침 준비와 혼성화 반응은 3DNA array detection system을 이용하여 수행하였다 (Genisphere, PA). 형광 표지된 cDNA 제작시 20 μ g Total RNA를 사용하였다. Array를 씻어낸 후 ScanArray scanner (Perkin-Elmer, Boston, MA)로 스캔하였다. 정상 RNA를 레퍼런스로 사용하여 DNA 칩상의 대다수 cDNA spots (85% 이상)이 검출됨을 확인하였다.

6) 데이터분석

이미지파일에서 IMAGEGEN 4.0 (Bio-discovery, Marina del Rey, CA)를 사용하여 1차 데이터를 얻은 후 Locally Weighted Scatterplot Smoothing (Lowess) method²⁵⁾를 사용하여 표준화하였다. 모든 칩상의 spot에서, 각 채널의 형광 강도가 배경의 형광 강도보다 1.4배 더 큰 경우에 한해 제대로 측정된 것으로 판단하여 선별하였고, 시료에서 제대로 측정되지 않은 것은 제외시켰다. 발현 비율은 CLUSTER를 이용하여 순차적 클러스터링한 후 TREEVIEW²⁶⁾ (M.B. Eisen, <http://rabam.lbl.gov>)를 이용하여 시각화하였다. 유전자 기능분석은

FatiGo algorithms ([Http://babelomics.bioinfo.cipf.es](http://babelomics.bioinfo.cipf.es))를 이용하여 수행하였다. 클래스간 비교분석을 통해 얻어진 결과는 False Discovery Rate (FDR) 값이 0.05 이하일 때 의미있는 것으로 판단하였다. 단백질 결합은 BOND 데이터베이스(<http://bond.nleashedinformatics.com>)에서 얻어진 인간단백질 데이터베이스로 cytoscape program (버전 2.4)을 이용하여 분석하였다.

3. 통계 처리

본 연구의 결과 내의 수치는 평균±표준편차 (Mean±SD)로 표기 하였으며, 발현 증가 및 감소된 유전자 간의 유의성 검증에는 Chi-square test를 사용하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 성 적

1. DNA 칩 이미지

Agilent mouse 45K 올리고 칩을 사용하여 세

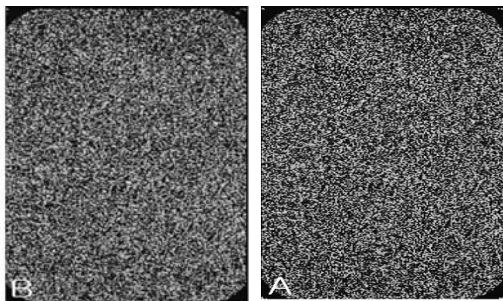


Fig. 1. Raw image of microarray

A total sequence set of ~45,000 oligo-nucleotides were printed onto glass microscope slides. The probe preparation and hybridization were performed using 3DNA array detection system with 20 μ g of total RNA from lung tissues. A, control group image; B, sample group image.

포의 전체 유전체 변이를 분석하였다. cy3와 cy5로 구성된 two colors system을 사용하였기 때문에, 적색과 녹색 스팟으로 표현되어졌다 (Fig. 1). Fig. 1-A는 천식을 유발한 대조군에서의 유전자 발현 양상을 나타내고, Fig. 1-B는 반하를 투여한 실험군에서의 유전자 발현 양상을 나타낸 것이다.

2. DNA 칩에서의 신호강도 (signal intensity)의 분포와 표준화

Fig. 1에서의 칩의 이미지로부터 cy3 와 cy5의 신호를 수치화하여 각각 축에 대응시킨 결과가 Fig. 2-A에 나와 있다. 그림에서 확인할 수 있듯이 대부분의 유전자의 경우 cy3 및 cy5의 신호강도가 서로 비례관계에 있음을 확인할 수 있었다. 또한 신호가 낮은 쪽일수록 편차가 크게 발생하고 있으며, 따라서 낮은 신호의 유전자일 경우 분석에 유의해야 함을 보여준다.

칩의 이미지에서 얻어진 데이터를 Lowess 기법 (25)을 사용해 표준화 하였으며 표준화 후 유전자의 분포를 발현 비율 (log 비)와 강도 (log 강도)간의 관계로 나타낸 것이 Fig. 2-B에 나와 있다. 표준화 과정을 통해 유전자의 발현 비율이 0을 기점으로 하는 일직선 형태로 변화되었다. Fig. 1에서와 마찬가지로 적색은 발현이 증가한 유전자이며, 녹색은 발현이 감소한 유전자이다.

3. DNA 칩 발현 프로파일

Fig. 3은 천식이 유발된 생쥐에 반하 추출물을 투여했을 경우의 유전자 발현 프로파일이다. 발현 변화를 보이는 유전자를 선택하여 비교하였다. 대부분의 유전자들은 실험군 및 대조군에서 유사한 발현 패턴을 보였다. 그러나 일부의 유전자는 대조군과 실험군에서 서로 다른 발현 패턴을 보였다. 이러한 유전자 발현 패턴을 6가지의 군으로 분류

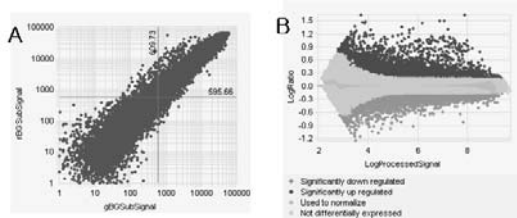


Fig. 2. Signal distribution of microarray(A). Vertical axis represents log cy5 intensity and horizontal axis represents log cy3 intensity. Normalization of microarray(B). Primary data from raw image were normalized using lowess method. Vertical axis represents log ratio and horizontal axis represents log intensity of all spots after normalization.

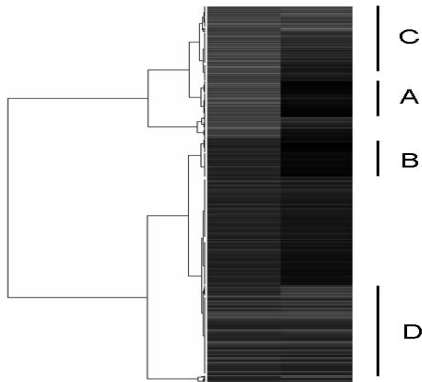


Fig. 3. Expressional profile of microarray

The normalized ratios were hierarchically clustered by using CLUSTER and then visualized using TREEVIEW program. Red, green, and black color represents up-regulation, down-regulation, and no change of gene expression, respectively. Genes decreased in control and not-changed in experiment (A), increased in control and not-changed in experiment (B), decreased in control and experiment (C) and increased in control and experiment (D) were clustered.

하였다 (A) 대조군에서 감소하였으나 실험군에서 변하지 않은 유전자, (B) 대조군에서 증가하고 실험군에서는 변하지 않은 유전자, (C) 대조군에서 감소하고 실험군에서 감소한 유전자, (D) 대조군에서 증가하고 실험군에서 증가한 유전자, (E) 대조

군에서 감소하고 실험군에서 증가한 유전자, (F) 대조군에서 증가하고 실험군에서 감소한 유전자 등으로 분류하였다. 전체 유전자 발현 프로파일에서 각 패턴의 위치는 Fig. 3에 표시되어 있다.

4. DNA 칩 발현 프로파일에서 정의된 6가지 군의 유전자 발현

각 군에 속하는 유전자들의 발현변화는 Fig. 4에 나타나 있다. Fig. 3에서처럼, 다른 발현을 보이는 유전자 대부분은 A, B, C, D군에 모여 있었다. 본 연구에서는 반하 추출물 처리에 의해 정상 수준으로 회복된 유전자를 찾는 것이 목적이기 때문에, A군과 B군에 초점을 맞추었다. A군에 속하는 유전자의 수는 860 종이었으며, B군에 속하는 유전자의 수는 1235 종이었다.

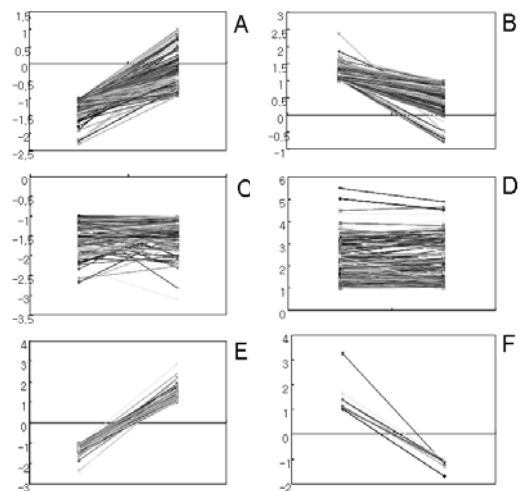


Fig. 4. Expression of genes in 6 subclasses defined in microarray

(A) genes decreased in control and not-changed in experiment, (B) increased in control and not-changed in experiment, (C) decreased in control and experiment, (D) increased in control and experiment, (E) decreased in control and increased in experiment, (F) increased in control and decreased in experiment.

5. A군에 속하는 유전자들의 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소 에서의 분포

A군에 속하는 유전자, 즉 대조군에서 발현이 감소하였으나 반하 추출물 처리에 의해 정상수준으로 발현이 복귀된 유전자의 기능분포를 살펴본 결과가 Fig. 5에 나와 있다. 생물학적 과정항목 (A)에 속하는 기능을 보면, biopolymer metabolic process, cellular macromolecule metabolic process, protein metabolic process, regulation of cellular process, signal transduction 등이 상대적으로 많이 분포하고 있었다. 분자기능항목 (B)에서는 ion binding, purinenucleotide binding, DNA binding, transmembrane receptor activity 기능들이 분포하고 있었다. 세포 구성요소 (C)에서는 intracellular, membrane, extracellular space 등에 상대적으로 많이 분포하고 있었다. 이들 대부분의 기능분포가 세포대사나 신호전달 기능과 연관된 것을 확인할 수 있었다.

6. A군에 속하는 유전자들의 pathway 분석

대조군에서 발현이 감소하였으나 반하 추출물 처리에 의해 정상 수준으로 발현이 복귀된 유전자 군인 A군에 속하는 유전자들이 관련되어 있는 pathway를 분석한 결과, MAPK pathway, regulation of actin cytoskeleton, focal adhesion 항목 등이 있음을 확인하였다 (Fig. 6-A, 6-B, 6-C, 6-D).

7. B군에 속하는 유전자들의 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소 에서의 분포

B군에 속하는 유전자들, 즉 대조군에서 발현이 증가하였으나 반하 추출물처리에 의해 정상수준으로 발현이 회복된 유전자들의 기능분포가 Fig. 7에

나와 있다. 생물학적 과정 항목에서는 Biopolymer metabolic process, signal transduction, regulation of cellular process 등이 B군에 속한 유전자들이 수행하는 대표적인 기능이다. 분자기능항목에서는 특이하게 zinc ion binding, ATP binding, rhodopsin-like receptor activity 등이 대표적인 기능이었는데, 생물학적 과정과는 다르게 대조군에서의 유전자 기능분포와 약간 상이하게 나타났다.

8. B군에 속하는 유전자들의 pathway 분석

대조군에서 발현이 증가하였으나 반하 추출물 처리에 의해 정상수준으로 발현이 회복된 B군의 유전자들의 pathway 또한 대조군에서 변화가 있었던 것이 정상으로 회복되고 있음을 알 수 있었다. Neuroactive ligand receptor interaction, MAK pathway, Regulation of actin cytoskeleton 등이 정상으로 회복되는 주 기능이다(Fig. 8).

9. A군과 B군에 포함된 유전자들의 pathway 분포

A군과 B군에 포함된 유전자들의 일반적인 기능 차이 외에 pathway 분포에서의 차이를 살펴본 결과 neuroactive ligand receptor interaction, purine metabolism, ribosome 과정이 유의적인 차이를 보이고 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 9). 특히, 가장 많은 변화를 보인 neuroactive ligand receptor interaction과 관련된 세부 항목 중에서 천식의 치료와 깊은 관련을 가지는 유전자 군으로는 Acetylcholine, 5-Hydroxytryptamine (5-HT), Prostaglandin과 관련된 유전자 군을 들 수 있다.



Fig.5-A. Biological process



Fig.5-B. Molecular function



Fig.5-C. Cellular component

Fig. 5. Functional annotation of genes contained in Class A. Expressional level of total 860 genes were restored in cells treated with Pinelliae Rhizoma extract

The functional distribution of these genes was analyzed in Biological Process (A), Molecular function (B), and Cellular component (C) category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Biological Process, Molecular function and Cellular component. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category.

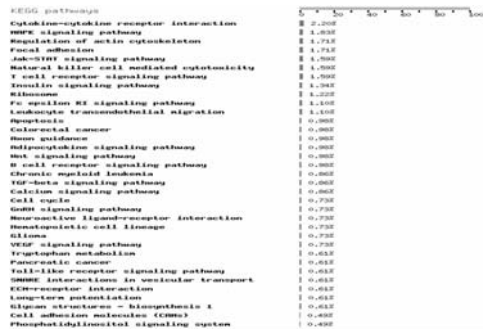


Fig.6-A. Pathway analysis

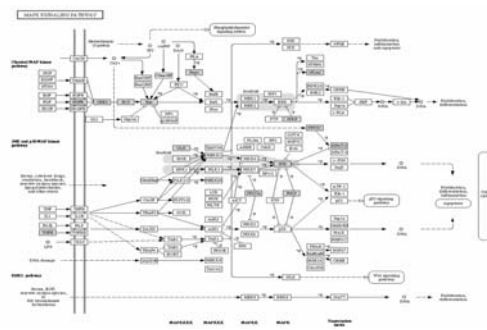


Fig.6-A. Pathway analysis

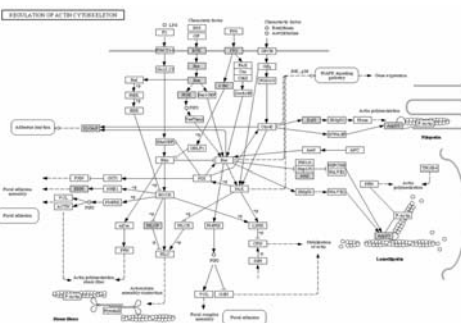


Fig. 6-C. Regulation of actin cytoskeleton

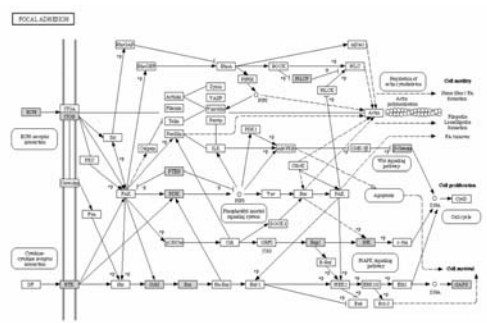


Fig. 6-D. Focal adhesion

Fig. 6. Pathway analysis of genes contained in Class A

Expressional level of total 860 genes were restored in cells treated with Pinelliae Rhizoma extract. The involvement of these genes on pathway was analyzed (A). The horizontal bar represents the percentage of genes on each pathway. The list was arrayed in decreasing percentage of pathway involvement, Top 3 pathways (B, C and D) were showed in detail in which the genes in Class A were colored in red. The represented pathways were obtained from KEGG.



Fig. 7-A. Biological process

Fig. 7-B. Molecular function

Fig. 7-C. Cellular component

Fig. 7. Functional annotation of genes contained in Class B.

Expressional level of total 1235 genes were restored in cells treated with Pinelliae Rhizoma extract. The functional distribution of these genes was analyzed in Biological Process (A), Molecular function (B) and Cellular component (C) category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Biological Process, Molecular function and Cellular component. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category.

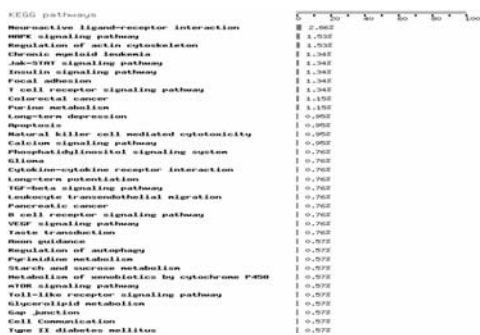


Fig. 8-A. Pathway analysis

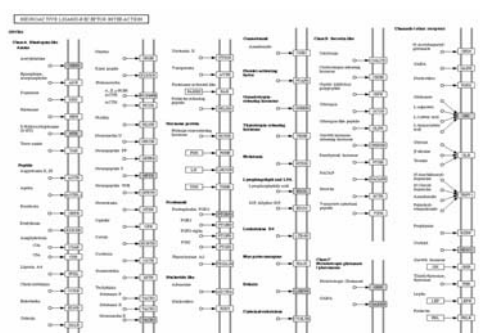


Fig. 8-B. Neuroactive ligand receptor interaction

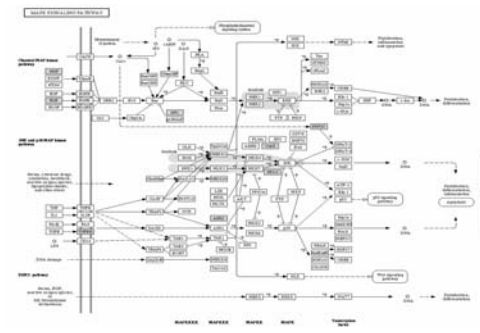


Fig. 8-C. MAKP pathway

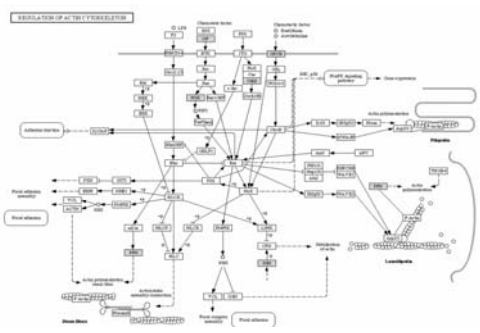


Fig. 8-D. Regulation of actin cytoskeleton

Fig. 8. Pathway analysis of genes contained in Class B.

Expressional level of total 1235 genes were restored in cells treated with Pinelliae Rhizoma extract. The involvement of these genes on pathway was analyzed (A). The horizontal bar represents the percentage of genes on each pathway. The list was arrayed in decreasing percentage of pathway involvement. Top 3 pathways (B, C and D) were showed indetail in which the genes in Class B were colored in red. The represented pathways were obtained from KEGG.

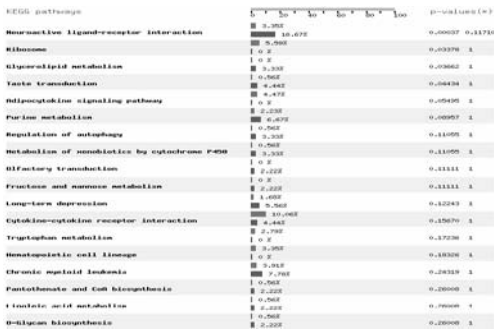


Fig. 9-A. Pathway analysis

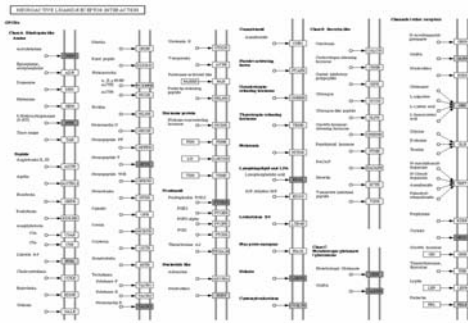


Fig. 9-B. Neuroactive ligand-receptor interaction

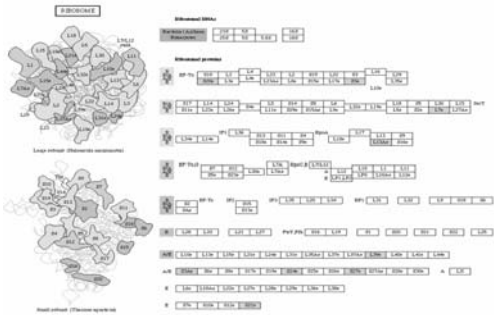


Fig. 9-C. Ribosome

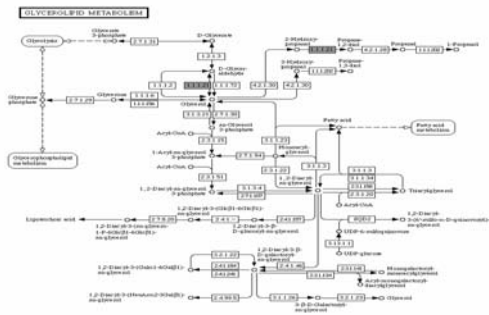


Fig. 9-D. Glycerolipid metabolism

Fig. 9. Pathway analysis between Class A and Class B genes in cells treated with Pinelliae Rhizoma extract.

Involvement of these genes on different pathway was analyzed (A). The horizontal bar represents the percentage of genes on each pathway. The list was arrayed in decreasing percentage of pathway involvement. Top 3 pathways (B, C and D) were showed in detail in which the Class A or Class B genes were colored in red or green, respectively. The represented pathways were obtained from KEGG.

IV. 고 찰

천식(asthma)은 기관지의 만성 재발성 염증질환으로 다양한 종류의 자극에 과민반응하여 발작성 수축을 일으키는 것을 특징으로 하며¹⁾ 이러한 증상이 저절로 혹은 치료로 호전 되는 가역성 기류 폐쇄를 나타내는 질환이다. 주로 어릴 때 많이 발생하는데 성인의 약 5%, 소아의 7~10%가 앓고 있다²⁾. 천식을 일으키는 원인으로는 알레르겐(allergen)의 흡입, 호흡기 감염, 스트레스, 공기오염, 기후, 약물, 운동 등이 있으며 이 중 알러지성 반응이 주 된 원인으로 받아들여지고 있다²⁷⁾.

천식의 전형적인 3대 증상은 발작적인 기침, 호흡곤란 및喘鳴이며 이중喘鳴은 필수적인 것으로 간주된다. 대부분의 경우 천식은 일과성(episodic)이며 3대 증상 모두가 관찰된다. 발작 시작 시 환자들은 대부분 마른기침과 흉부의 압박감을 느낀다. 그 후에 호흡이 점차 거칠게 들리고 呼吸 및 吸氣시 천명이 현저해지면서 呼吸가 길어지고, 빈 호흡, 빈맥, 경한 수축기 고혈압이 흔히 나타난다¹⁾. 천식은 흔히 밤에 악화되며 야간 천식은 대개 새벽 3~4시에 심한데 이 시간이 기관지 근육 긴장도와 기관지 반응성의 일 중 변동으로 기관지 수축이 잘 오기 때문이다²⁸⁾.

천식의 치료법은 원인 알레르겐 및 악화 인자를

회피하는 환경요법, 원인 알레르겐을 소량씩 피하 주사로 반복 시행하여 원인 알레르겐에 대한 감수성을 약화시켜 증상의 호전을 유도하는 면역요법 등이 있으며 최종 단계로 steroid를 경구 투여하는 방법을 사용한다³⁾.

한의학에서 喘息은 哮喘症에 해당하는 질환으로, 哮와 喘은 구분할 수 있어 喉中有聲響한 것을 哮라 하고 呼吸急促한 것을 喘이라 말한다⁴⁾. 따라서 哮喘은 일반적으로 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 것을 지칭하는 것이다⁶⁾. 哮喘은 隋代 巢²⁹⁾의 《巢氏諸病源候論》에서 “上氣鳴息”, “呻嗽”라고 칭하는 것에서 그 유래를 찾아볼 수 있으며, 그 병인을 肺의 장기적인 기능실조로 보았다.

喘息의 원인으로는 巢²⁹⁾, 朱³⁰⁾, 樓³¹⁾ 등은 痰飲을 原因이라고 하였고 張³²⁾은 “夙根”이라 하여 遺傳이나 臟腑의 機能低下 등의 내재적 素因을 가지고 있는 사람이 過寒과 過勞시 발생한다고 하였다. 그리고 疔³³⁾은 哮喘의 원인을 첫째 冷한 음료나 혹은 鹹, 酸, 甘味를 지나치게 嗜食하게 되면 積痰 蘊熱하여 발생하게 되고, 둘째 外感病邪를 초기에 表散시키지 못하여 餘邪가 肺絡에 잠복해 있다가 다시 外邪가 침범하면 발병하게 되며, 셋째 내재된 素因을 가지고 있는 사람이 寒冷, 疲勞 등 어떤 誘因을 만나서 발생하게 되고, 넷째 특성의 냄새에 대한 과민반응으로 발생되며, 다섯째 肺, 腎의 呼吸機能 低下로 발생하게 된다고 정리하였다.

哮喘의 치료는 朱³⁴⁾의 補陰, 降心火, 降痰下氣의 치법과 王³⁵⁾의 外邪와 攝生에 대한 주의 그리고 張³²⁾의 虛實辨別에 의한 扶正氣, 攻邪氣의 治法을 기본으로 하였다. 최근에는 小青龍湯¹³⁻¹⁴⁾, 定喘化痰降氣湯¹⁵⁾, 麥門冬湯¹⁵⁾, 神祕湯¹⁶⁾, 定喘湯¹⁷⁾과 清上補下湯¹⁸⁾, 瀉白散³⁶⁾ 등이 천식에 효과가 있다는 연구보고가 있었고, 임상에서 활용되고 있다.

哮喘에 다용되는 반하는 《神農本草經》³⁷⁾ 下品에 “味辛平, 主傷寒, 寒熱, 心下堅, 下氣, 咽喉腫痛, 頭眩風瘡, 咳逆腸鳴, 止汗”이라고 최초로 기재되었

고 기원은 天南星科(Araceae)에 속한 多年生 本草인 芫花의 塊莖으로 性味는 辛, 溫, 有毒하고 脾, 胃, 肺經으로 歸經하며 化痰止嘔, 燥濕降逆, 消痞散結의 效能이 있어 痰多喘咳, 痰飲眩暈, 風痰眩暈, 痰厥頭痛, 胸膈痞悶 등의 症狀을 치료한다⁷⁾. 구성 성분으로는 정유와 소량의 지방, 전분, nicotine, 점액질, asparagin산, glutamine, β-amino산 등의 amino산과 β-sitosterol, choline, β-sitosterol-β-d-glucoside 3, 4-dihydroxybenzaldehyde 등이 함유되어 있다⁷⁾. 약리작용으로는 氣管支의 分泌物를 증가시키고 痰液을 배제하는 작용이 있어 急慢性咳嗽, 痰多, 胸悶氣急, 咳喘 등의 症에 多用된다³⁸⁾.

이에 대한 연구로는 洪⁸⁾등의 半夏藥鍼의 기관지 상피세포 TARC 분비에 관한 연구가 있으며, 半夏가 사용된 처방들⁹⁻¹⁸⁾에 관해서도 많은 연구가 보고 되었다.

천식과 관련하여 최근 연구를 살펴보면 宋¹⁹⁾의 半夏가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향에 관한 연구, 鄭³⁹⁾의 난황으로 유발된 생쥐의 알레르기성 천식에 미치는 영향에 관한 연구 등에서 半夏가 천식의 각종 지표들을 개선하여 천식 치료에 우수한 효과가 있음을 밝혔다. 이에 저자는 이미 알려진 반하의 천식에 대한 효과에 대한 기전 탐구를 유전자 발현 측면에서 시행하고자 하여 본 실험을 기획하였다.

Microarray에 사용되는 DNA 칩은 수천개 이상의 유전자 발현 변이를 단 한번의 실험으로 확인할 수 있기 때문에 가장 각광받는 최신 기술이며, Microarray의 기술이 발전하고 있고 다양한 DNA 칩이 개발되면서 Microarray법을 이용한 연구 및 데이터들이 비약적으로 증가하고 있는 추세이다⁴⁰⁻⁴²⁾.

일반적으로 Microarray법을 이용한 연구는 Microarray 이미지 생성, 이미지 분석, 통계 분석, 생물학적 의미 추출이라는 4단계를 거쳐 완성된다.

또한 Microarray 이미지 생성의 단계에는 DNA 칩 제작, 샘플 준비, Hybridization 그리고 스캐닝 작업으로 구성된다⁴²⁾. DNA 칩을 제작하는 방법에는 많은 방법들이 확립되어져있는데, 유리슬라이드에 미세침으로 찍는 방법, 기성 masks를 이용한 광식각법, 잉크젯 프린팅이나 마이크로일렉트로드 어레이상의 일렉트로케미스트리 기법 등이 있다⁴³⁻⁴⁴⁾. 다양한 종류의 DNA 칩이 만들어졌지만, DNA 칩의 주목적은 유전자발현측정이나 유전자변이확인이다.

현재 사용되고 있는 약물 기전을 밝히기 위해서 대용량 분석을 통해 얻어진 모든 종류의 데이터를 시스템 생물학을 이용하여 분석하는 접근법이 최근 일반적으로 사용되고 있어서⁴⁵⁾, 본 연구에서도 시스템 생물학을 이용한 분석 방법을 채택하였다.

본 연구에서는 생쥐에 유발된 천식에 대한 반하의 효과를 분자수준에서 파악하기 위하여

DNA 칩을 이용하여 유전자들의 발현정도를 측정하였다. 발현이 증가된 유전자와 감소한 유전자의 수가 많으므로 ontology에 기초해 기능분석을 하여 유전자들을 평가하는 것이 적합하여, 본 연구에 결과에 나타내지는 않았지만 Fig. 1-A의 이미지 분석을 통해 천식의 유발로 인해 발현이 증가한 유전자의 경우 2120개, 발현이 감소한 유전자는 1150개가 선별되었는데, 발현증가의 경우 2배 이상, 발현감소의 경우 1/2 이하의 발현량을 보일 때를 증가 감소의 기준으로 삼았다.

전반적으로는 Fig. 1에서 보였듯이 천식의 유발 및 반하 추출물 투여에 의한 전체 유전자의 발현 변화는 전반적으로 큰 변화가 없는 것처럼 보인다. 하지만 세밀하게 보면 각 실험군 사이에 발현 차이를 보이는 몇 개의 유전자군을 선별할 수 있다. 대표적인 변화군으로다음의 6개 군을 선택하였다. (A) 대조군에서 감소하였으나 실험군에서 변하지 않은 유전자, (B) 대조군에서 증가하고, 실험군에서는 변하지 않은 유전자, (C) 대조군에서 감소하

고 실험군에서 감소한 유전자, (D)대조군에서 증가하고 실험군에서 증가한 유전자, (E) 대조군에서 감소하고 실험군에서 증가한 유전자, (F) 대조군에서 증가하고 실험군에서 감소한 유전자등으로 분류하였다.

이번 연구의 목표는 반하 추출물을 통한 손상의 회복이기 때문에 주로 A군이나 B군에 포함된 유전자들을 대상으로 분석을 수행하였다. A군과 B군에 포함된 유전자들 모두 원래 대조군에 포함된 유전자들의 기능과 매우 유사한 기능분포를 보이고 있음을 확인하였으며, pathway 분석에서도 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 이는 천식의 유발에 의해 손상된 기능이 반하 추출물 처리에 의해 정상수준으로 회복되고 있음을 보여준다. 하지만 Fig. 1-B에서볼 수 있듯이 기능이 정상으로 회복되는 유전자의 수는 전체 대조군의 변화된 유전자수에비해 상대적으로 적음을 알 수 있다. 즉 반하 추출물 투여에 의해 유전자 차원에서 기능이 회복되기는 하지만 완벽히 천식 유발에 의한 손상을 복구시키지는 못하였다는 것을 확인할 수 있다.

본 연구에서 결과로 제시하지는 않았지만, 대다수의 유전자들이 천식 유도를 위한 Ovalbumin과 Alum 처리에 의해 발현이 크게 변화하지 않고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 약물처리에 의해 발현이 증가된 유전자는 2120 종, 발현이 감소한 유전자는 1150 종으로총 3270 종의 유전자들의 발현이 변화되었으며 이는 DNA칩에 존재하는 유전자를 기준으로 약 7% 정도밖에 되지 않는 숫자이다. 그러나 이들 유전자들의 수가 많기 때문에 유전자의 발현정도 및 기능을 개별적으로 접근하는 데는 많은 어려움이 따르므로, 유전자 Ontology에 기반을 둔 기능분류를 하는 것이 바람직하다. 유전자 Ontology는 유전자들을 크게 다음의 세 가지 항목으로 구분하여 분류해 놓은 것으로 첫째 생물학적 과정항목, 둘째 분자기능 항목, 셋째 세포내 구성항목이다. 약물처리에 의해 발현이 변화되는

유전자들을 이들 기준에 의해 기능분류를 해본 결과 많은 유전자들이 일반적인 세포대사에 관련 되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 비록 발현이 증가 또는 감소되는 유전자들 사이의 기능분포가 비슷하지만, 이들 유전자 군사이의 기능분포차이를 비교한 결과 동일한 기능이라도 변화된 유전자내에서 분포하는 정도가 차이를 보이고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 약물 처리에 의해 변화된 유전자들의 기능을 정확히 예측하기 위해서는 발현이 증가 또는 감소되는 유전자들의 공통적인 기능 및 차별적인 기능을 동시에 고려해서 판단해야 할 것이다. 변화된 유전자들의 기능분포 외에 직접적으로 이들 유전자들이 관련된 세포내 pathway에 대해서 분석을 수행한 결과 유전자들의 기능분포 분석에서와 마찬가지로 증가 또는 감소된 유전자 간에 비슷한 결과를 얻었다. 하지만 단순한 기능분석의 나열보다 pathway 분석의 경우 더 많은 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어 MAPK pathway 경우 발현이 증가된 유전자와 감소된 유전자가 관여하는 지점이 서로 매우 상이함을 알 수 있다. 이는 비록 동일한 pathway가 관련된다 할지라도 pathway 전체에 미치는 영향은 서로 다를 수 있다는 것을 나타낸다. 이와 같이 동일한 기능 및 pathway가 발현이 증가되거나 감소된 유전자들 사이에서 공통으로 선별되지만 실제 유전자들의 개개의 역할을 고려해야만 해당 pathway의 전체적인 활성화 방향을 예측할 수 있다. 한편 발현이 증가한 유전자와 감소한 유전자간에 가장 상이한 pathway를 비교해본 결과 neuroactive ligand receptor interaction, purine metabolism, ribosome 과정 등이 선별되었으며, 특히 neuroactive ligand receptor interaction과 관련된 세부 내용 들이 천식의 발현 및 악화와 관련된 항목들이 많았다.

천식과 관련하여 매우 중요한 역할을 담당하고 있는 neuroactive ligand-receptor interaction

pathway는 생체 내에서 아세틸콜린, 도파민 등의 신경전달 물질을 포함한 각종 전달 물질이 신호를 주고받는 체계이다⁴⁶⁾. 수 많은 Neuroactive ligand-receptor interaction pathway에 관여하는 물질 중에서 천식과 관련된 몇 가지 경로를 설정할 수 있다. 본 연구 결과에서 Rhodopsin-like receptor activity, Prostanoid 계열의 경로의 변화를 살펴볼 수 있었다. Rhodopsin-like receptor activity는 아세틸콜린, 세로토닌 (5-HT), 도파민 등의 신경전달 물질과 관련된 경로이다⁴⁷⁾. 이 중에서 특별히 눈여겨 보이는 것은 바로 아세틸콜린 및 세로토닌 (5-HT)에 대한 반하 추출물의 영향이다. 본 연구의 결과에서, 천식에 의하여 유의한 수준으로 발현 정도가 증가된 아세틸콜린 및 5-HT와 관련된 유전자군을 반하 추출물 투여를 통하여 정상군 수준으로 발현 정도를 낮출 수 있었다. 일반적으로 천식 치료제는 크게 교감신경 자극제, methylxanthines, 당질코르티코이드, 비만 세포 안정제 그리고 항콜린제이다. 일반적으로 항콜린제들은 아세틸콜린 계열의 자극에 길항하여 천식환자에서 기관지확장 작용을 일으킨다⁴⁸⁾.

또한, 세로토닌이라고도 불리는 세로토닌(5-HT)은 염증반응을 악화시키는 요소이기도 하며, 기관지 수축작용을 가지고 있기 때문에 임상에서 천식 치료의 목표중 하나로 여겨진다⁴⁹⁾. 5-HT에 대한 receptor로는 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5A, 5-HT7이 대표적으로 알려져 있다⁵⁰⁾.

또 하나 상기할 만한 점은 반하의 투여가 천식 유발에 의하여 상승된 Prostaglandin 관련 유전자의 발현 수준을 정상 수준으로 낮추었다는 점이다. 본 연구의 결과에서 Prostaglandin D2(PGD2)와 receptor에 관련된 유전자의 발현이 정상 수준으로 낮아졌다. Prostaglandin은 강력한 혈관 확장 물질이며, 염증 유발 물질이다. Prostaglandin D의 receptor gene (PTGDR)은 인간 염색체 14q22.1 상에 위치하며, 천식의 유발 및 악화에 관여한다는

사실이 알려져 있다⁵¹⁾. 또한, PTGDR의 발현 정도와 Th2 계열의 chemokine 분비량은 비례적 상관관계를, 호산구의 Apoptosis와는 서로 반비례 관계를 가지는 것이 최근에 알려졌다⁵²⁾. 따라서, 이러한 결과는 반하 추출물이 가지는 천식 치료 효과에 대한 기전 연구에 매우 중요한 단서가 될 수 있다. 이들 pathway가 약물처리에 미치는 영향에 대해서는 앞으로 심도 있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구의 결과에서 제시하지는 않았지만, 약물처리에 의해 변화되는 유전자 중에서 향후 새로운 약물의 신규 타겟이 될 수 있는 유전자를 선별하기 위하여 단백질 상호작용을 이용한 네트워크 분석을 수행한 결과, 증가된 유전자로부터 생성되는 단백질의 경우 전반적인 세포의 증식 및 분화에 관여하는 Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), 인체 내에서 자기(self)와 비자기(non-self)의 인식을 비롯한 각종 면역 반응에 관여하는 MHC class I의 구성물질인 Beta-2-microglobulin (B2M), 와 조기발현단백질의 일종이며, 세포 분화와 관련이 있는 FOS 단백질등이 중심체로 작용하여 다른 단백질과 상호 연결되어 있음을 확인할 수 있다. 발현이 감소되는 유전자들의 경우에는 Apoptosis를 포괄하는 개념으로 세포 예정사라고 번역되는 Programmed cell death 6 (PDCD6), 신경 분절 접합 및 신호 전달에 주요한 역할을 담당하고 있는 Glutamate receptor interacting protein 1(GRIP1)과 신경 형성 및 분화 과정에 관여하는 Disabled-1 (DAB1) 단백질이 네트워크 중심부에 있다. 이는 이들 단백질이 약물처리에 의해 변화되는 단백질의 네트워크에서 중심적인 역할을 수행할 수 있다는 것을 의미하며, 이들 단백질을 이용하여 신규 약물의 개발이 가능할 것으로 보여진다.

결론적으로 발현이 증가되거나 감소한 유전자들은 대부분 대사과정에 연관된 유전자들이었다. 발

현이 증가하거나 감소하는 유전자들의 pathway 분석 및 기능분포 비교분석을 수행한 결과 동일한 기능 및 pathway에 연관되었다 하더라도 작용하는 위치 및 정도에 차이가 있다는 것을 확인하였다. 한편 대조군에 반하 추출물을 처리하였을 경우 변화된 유전자들의 일부가 원래의 정상기능으로 회복되고 있음을 유전자들의 기능분포 분석, pathway분석을 통해 확인하였다. 이를 통해 반하의 약효를 유전자 차원에서 설명할 수 있을 것으로 보여진다.

이상의 결과들을 바탕으로 본 저자는 반하 추출물의 천식에 대한 치료 효과가 neuroactive ligand receptor interaction 경로나 이와 관련된 물질들의 활성도 감소와 관련이 있을 것으로 생각하며, 이러한 결과는 추후 반하의 천식 치료 기전 연구에 중요한 자료가 될 것으로 생각한다.

V. 결 론

반하가 가지는 천식 치료와 관련된 기전을 구명하기 위하여 난황의 비강내 점적을 통하여 천식을 유발하고 반하 추출물을 투여한 다음 얻어진 폐조직으로부터 유전자 발현 정도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 천식 유발 및 반하 추출물 투여에 의하여 발현이 변화한 유전자는 총 3270종으로 DNA칩에 존재하는 유전자를 기준으로 약 7% 정도였다.
2. 대조군에서 발현이 감소하였으나 실험군에서 정상 수준으로 발현이 회복된 유전자는 860 종이었고, 대조군에서 발현이 증가하였으나 실험군에서 정상 수준으로 발현이 감소한 유전자 수는 1235 종이었다.
3. 대조군에서 발현이 감소하였으나, 실험군에서 정상 수준으로 발현이 회복된 유전자들의 기능

분포는 대부분 신호전달 기능과 연관되어 있었다.

4. 대조군에서 발현이 감소하였으나, 실험군에서 정상 수준으로 발현이 회복된 유전자들과 관련된 생체 내 대사 경로는 MAPK pathway, regulation of actin cytoskeleton, focal adhesion 등이었다.
5. 대조군에서 발현이 증가하였으나, 실험군에서 정상 수준으로 발현이 감소한 유전자들은 세포 대사나 신호전달 기능과 관련 있었고, 특히 zinc ion binding, ATP binding, rhodopsin-like receptor activity 등에서 상이한 결과를 보였다.
6. 대조군에서 발현이 증가하였으나, 실험군에서 정상 수준으로 발현이 감소한 유전자와 관련된 생체내 대사경로는 Neuroactive ligand receptor interaction, MAKP pathway, Regulation of actin cytoskeleton 등이었다.
7. 상기한 두 군에 포함된 유전자들의 동일 경로 상에서의 분포도는 neuroactive ligand receptor interaction, purine metabolism, ribosome 과정에서 상이한 차이를 보였다.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 2004;458.
2. 대한내과학회 편저. 해리슨 내과학 Volume 2. MIP. 2003;150.
3. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울:군자출판사. 2002;13-33, 244-50.
4. 上海中醫學院編. 中醫內科學 1. 香港:商務印書館香港分館. 1975;17-23.
5. 北京中醫學院編. 漢醫學臨床病理. 서울:成輔社. 1983;180-6,291.
6. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室 編著. 東醫肺

系內科學. 서울:국진. 2004;486.

7. 全國韓醫科大學 本草學教室 共著. 本草學. 서울;永林社. 1995;448-9
8. 홍재화, 서정철, 임성철, 정태영, 한상원. 반하 약침액이 사람 기관지 상피세포와 TARC 분비에 미치는 효과. 대한침구학회지. 2005;4(1); 155-64.
9. 이영자, 신조영. 杏仁半夏湯이 GUINEA PIG의 氣管支 平滑筋에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1992;13(1):124-34.
10. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 경희의학. 1999;5(1):78-89.
11. 김영훈, 김병운. 半夏芩朮湯의 진통, 소염에 관한 실험적 연구. 경희의학. 1985;1(1):111-5.
12. 권현, 정승기, 이형구. 柴梗清肺湯과 柴梗半夏湯이 Xylene으로 인한 흰쥐의 폐부종에 미치는 영향. 경희의학. 1989(3):337-46.
13. 황우석, 이재성, 최준용, 정희재, 이형구, 정승기. 小青龍湯으로 호전된 천식을 동반하는 만성부비동염 2례. 대한한의학회지. 2003;24(1): 207-12.
14. 이준우, 정희재, 정승기, 이형구. 소청룡탕이 알레르기 천식모델 흰쥐의BALF내 면역세포에 미치는 영향. 경희의학. 2001;17(2):242-53.
15. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동탕과 정천화담강기탕이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 경희의학. 2002;23(1):7-49.
16. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 신비탕 및 가미신비탕이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF 내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한의학회지. 2002;23(2):198-210.
17. 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 정천탕과 정천탕가감방이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영

- 향. 대한한의학회지. 2003;24(1):169-80.
18. 정승기, 황우석, 주찬엽, 이재성, 조일현, 정희재. 청상보하당의 기관지 천식환자에 대한 임상적 효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):151-60.
 19. 송재진. 반하가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):156-68.
 20. Tsitoura DC, Blumenthal RL, Berry G, Dekruyff RH, Umetsu DT. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: role of tolerance and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(2):239-46.
 21. 김형우, 조수진, 김부여, 백진웅, 정현우, 조수인. 蔘蘇飲이 천식이 유발된 생쥐의 Cytokine 분비에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007; 22(2):175-80.
 22. Florell SR, Coffin CM, Holden JA, Zimmermann JW, Gerwels JW, Summers BK, Jones DA, Leachman SA. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Mod Pathol*. 2001;14(2):116-28.
 23. Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Elashoff M, Martínez-Murillo F, Miller CL. Quality control for microarray analysis of human brain samples: The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. *J Neurosci Methods*. 2007 30;165(2):198-209. Epub 2007 Jun 7.
 24. Kwon KH, Kim SJ, Kim HJ, Jung HH. Analysis of gene expression profiles in cholesteatoma using oligonucleotide microarray. *Acta Otolaryngol*. 2006;126(7):691-7.
 25. Zahurak M, Parmigiani G, Yu W, Scharpf RB, Berman D, Schaeffer E, Shabbeer S, Cope L. Pre-processing Agilent microarray data. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:142.
 26. Pavlíček A, Hrdá S, Flegr J. Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol (Praha)*. 1999;45(3):97-9.
 27. 韓鏞徹. 臨床呼吸器學. 서울:一潮閣. 1995: 208-25.
 28. 전국의과대학교수 역. 오늘의 진단 및 치료. 서울:한우리. 1999:287.
 29. 巢元方. 諸病源候論.(卷 13,14) 서울:대성문화사. 1992:106-17.
 30. 朱橚. 普濟方. 北京:人民衛生出版社. 1982:1789.
 31. 樓英. 醫學綱目. 北京:中國中醫藥出版社. 1996: 598.
 32. 張介賓. (國譯)景岳全書(二). 서울: 일증사. 1992:354-64.
 33. 정승기, 이형구. 哮喘의 原因 및 治法에 관한 연구. 대한한의학회지. 1986;7(1):60-7.
 34. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울:대성문화사. 1993: 328-33.
 35. 王肯堂. 證治準繩(一). 북경:인민위생출판사. 1991:229-31.
 36. 조일현, 정희대, 이형구, 정승기. 사백산이 천식에 미치는 효과에 대한 분자생물학적 연구. 경희의학. 2001;17(2):214-29.
 37. 神農本草經. 北京:科學技術文獻出版社. 1996:92-3.
 38. 金載益. 臨床本草學講座. 서울:대성의학사. 2001:828-9.
 39. 정동환. 반하가 난황으로 유발된 생쥐의 알레르기성 천식에 미치는 영향. 대한한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(1):38-54.
 40. Page GP, Zakharkin SO, Kim K, Mehta

- T, Chen L, Zhang K. Microarray analysis. *Methods Mol Biol.* 2007;404:409-30.
41. Hoheisel JD. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet.* 2006;7(3):200-10.
 42. 이미경, 최정현, 조환규. 마이크로어레이 실험 및 분석 데이터 처리를 위한 통합 관리 시스템의 설계와 구현. *한국미생물생명공학회지.* 2003;31(2):182-90.
 43. Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE: High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors Bioelectron* 1996;11:687-90.
 44. Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He YD, Stephaniants SB, Cavet G, Walker WL, West A, Coffey E, Shoemaker DD, Stoughton R, Blanchard AP, Friend SH, Linsley PS. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol.* 2001;19(4):342-7.
 45. Hong Y, Ho KS, EuKW, Cheah PY. A susceptibility gene set for early onset colorectal cancer that integrates diverse signaling pathways: implication for tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2007;13(4):1107-14.
 46. Bergeron R, de Montigny C, Debonnel G. Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci.* 1996;16(3): 1193-202.
 47. Goudet C, Gaven F, Kniazeff J, Vol C, Liu J, Cohen-Gonsaud M, Acher F, Prézeau L, Pin JP. Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(1):378-83.
 48. K. J. Isselbacher, E. Braunwald, J. D. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci, D. L. Kasper. *Harrison's principles of internal medicine.* 13th ed. Seoul: Jung Dam. 1997:1258-64.
 49. Webber SE, Salonen RO, Corfield DR, Widdicombe JG. Effects of non-neural mediators and allergen on tracheobronchial blood flow. *Eur Respir J Suppl.* 1990 ;12:638-43.
 50. Fink KB, Göthert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev.* 2007;59(4):360-417.
 51. Oguma T, Palmer LJ, Birben E, Sonna LA, Asano K, Lilly CM. Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *N Engl J Med.* 2004;351:1752-63.
 52. Lilly CM, Palmer LJ. The role of prostaglandin D receptor gene in asthma pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(3):224-6.