

배양대뇌신경세포 저산소증모델에서 반하에 의한 유전자표현의 변화

권건록 · 정현정 · 신길조 · 문일수¹ · 이원철² · 정승현*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, ¹동국대학교 의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원

Received January 5, 2009 / Accepted May 8, 2009

Microarray Analysis of Gene Expression Affected by Water-extracts of *Pinelliae rhizoma* in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Gun-Rok Kwon, Hyun-Jung Jung, Gil-Jo Shin, Il-Soo Moon¹, Won-Chul Lee² and Seung-Hyun Jung*. *Dept. of Oriental Medicine, and*¹*Department of Anatomy, Dongguk University,* ²*Pusan National University School of Oriental Medicine - Pinelliae rhizoma* (Pr, 半夏) is a traditional medicine used in the treatment of incipient stroke. We investigated the effects of Pr on gene expression in a hypoxic model using cultured rat cortical cells. Pr (2.5 µg/ml) was added to the culture medium on DIV 12. A hypoxic shock (2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hr) was given two days later (on DIV 14), and total mRNAs were isolated at 24 hr post-shock from both Pr-treated samples and untreated control cultures. Microarray using TwinChipTM Rat-5K (Digital Genomics, Seoul) indicated that Pr upregulated genes for cell growth and differentiation (*tubb5*, *tgfa*, *ptpn11*, *n-ras*, *pdgfa*) and anti-apoptosis (*mcl-1*), while downregulating the apoptosis-induced gene (*tie2*). Therefore, it is interpreted that Pr protects neurons from hypoxic shock by maintaining cell growth and differentiation and by preventing apoptosis.

Key words : Cortical cell culture, hypoxia, microarray, *Pinelliae rhizoma*

서 론

반하(半夏, *Pinelliae rhizoma* .Pr)는 천남성과의 15~30 cm 되는 다년생 초본의 구근으로 조습화담(燥濕化痰), 소비산결(消痞散結), 강역지구(降逆止嘔)하는 효능이 있다[28]. 반하에는 phenol류인 homegentisic acid, homegentisic acid glucoside, 3,4-dihydroxybenzaldehyde와 alkaloid인 ephedrine이 0.002% 정도 함유되어 있다[57]. 반하에 관한 연구로는 기침억제[57], 구토억제[37], 항암효과[54] 등이 보고되어 있다. 반하는 반하후박탕(半夏厚朴湯), 반하사심탕(半夏瀉心湯) 등 호흡기계와 소화기계에 작용하는 처방 뿐만 아니라, 성향정기산(星香正氣散), 도담탕(導痰湯) 등 중풍(中風) 급성기의 처방(處方)에도 많이 사용된다[22].

현대 사회는 인구의 노령화로 뇌혈관질환의 발병률이 점차 증가하고 있으며[15], 2006년 사망원인 통계연보에 따르면 뇌혈관질환은 전체 사망인구의 12.3%로, 악성 신생물(27%) 다음으로 높은 비중을 차지하고 있다. 뿐만 아니라 뇌혈관질환은 비가역적인 신경손상을 초래하여 심각한 후유증을 동반하게 된다. 신경세포는 세포 생존을 위하여 혈액 순환에 의한 지속적인 영양과 산소의 공급을 필요로 한다. 임상에서 뇌신경세포는 뇌허혈 및 심정지 등으로 인한 심박출량 감소, 폐질환 및 이산화탄소 중독 등으로 인한 혈중 산소분압의 저하 등에 의해 저산소증 상태에 빠지게 된다[15]. 결국 신경세포는 산소

공급이 저하되면 신경세포막을 통해 이온들의 이동을 조절하고, 에너지 생산 저하에 따른 에너지 소모를 줄이며, hypoxia-inducible factor (HIF)-1과 nuclear factor kappa B (NFκB) 등의 transcription factor를 활성화시켜 특정 유전자들의 발현을 유도한다[21,40,47]. 그러나 신경세포가 저산소증에 대해 전혀 방어능력이 없는 것은 아니다[23,38]. 신경세포에는 다수의 산소감지자(O₂ sensor)가 있는데 이 가운데 산소에 민감한 Na⁺이온통로와 K⁺이온통로, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 등은 직접 O₂와 접촉하여 신경세포의 흥분성을 조절하게 된다[35]. 동물세포는 세포내 산소압의 변화에 반응할 수 있는 유전자 프로그램을 갖고 있다. 즉, 몸에 공급되는 산소가 부족하면 산화적 스트레스에 대응하기 위해 항산화스트레스 유전자들의 발현을 증가시키며, 적혈구 생성(erythropoiesis)과 혈관신생(angiogenesis)이 촉진된다[17,31]. 또한 줄어든 ATP 생성을 만회하기 위하여 해당(glycolysis)과 포도당 수송(glucose transport)에 관여하는 유전자 발현을 증가시켜 포도당 이용 속도를 증가시킨다[14,46,48-50].

지금까지 의학을 포함한 생명과학 분야의 대부분의 연구는 관심의 대상이 되는 특정 유전자를 먼저 선정하고, 그 유전자 발현의 변화에 초점을 맞춘 연구가 주종을 이루어왔다. 그 방법으로 mRNA에 대한 실험은 northern blot이나 in situ hybridization이 이용되어 왔고, 단백질 수준에서의 변화는 western blot이나 면역세포화학법(immunocytochemistry)을 이용한 실험이 사용되어 왔다. 그러나 최근 동 시간대에 변화를 보이는 많은 유전자를 한꺼번에 관찰할 수 있는 기법들이 개발되었다. 여기에는 differential display, subtraction hy-

*Corresponding author

Tel : +82-31-961-9040, Fax : +82-31-961-9000

E-mail : omdjeong@naver.com

bridization[32]을 포함해 가장 최근에 개발되어 사용되고 있는 cDNA microarray 기법 등이 있다[6,45]. 대부분의 조직내 mRNA의 발현 변화는 아주 미약하기 때문에 검사 기법 선택의 주요관건은 어떤 방법이 이 미약한 발현 변화를 보다 더 민감하게 발견해 낼 수 있는가 하는 점이다. cDNA microarray는 검사 속도의 측면에서나 반복 검사 시 일관성 있는 결과를 얻을 확률이 가장 높다는 점에서 다른 두 검사법에 비하여 보다 더 관심의 대상이 되고 있다. 이론대로라면 다양한 조건에서 수백 혹은 수천 개 유전자의 발현 변화를 동시에 관찰할 수 있는 획기적인 실험 기법이다. 최근에는 관련된 유전자끼리 그룹화한 microarray가 상품화되어 더욱 더 그 검사가 용이해졌다[8].

반하가 예로부터 뇌졸중의 치료와 예방에 사용되었음에도 불구하고 뇌신경세포의 보호 작용과 그 기전에 대한 연구가 없었으므로, 저산소증을 유발한 흰쥐 대뇌신경세포에 반하를 처리하여 cDNA microarray 기법을 이용하여 유전자 표현 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

동물

본 연구는 임신 18일(Embryonic day 18, E₁₈)의 Sprague-Dawley계 흰쥐(대한동물실험센터)를 사용하였다.

약재 및 추출액 제조

실험에 사용된 반하는 대한약전 및 대한약전 외 한약 규격주해[25]에 근거하여 동국대학교 부속 한방병원에서 구입하였다. 반하(2 g)에 20 ml의 증류수를 넣어 균질화하고 4°C에서 18시간 진탕하였다. 이를 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 얻고 여과막(0.45 µm)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1 ml 추출액 튜브를 이동하여 3 반복으로(triplicate) 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

신경세포 배양

E₁₈의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌피질신경세포를 Brewer 등[2]의 방법에 따라 배양하였다. E₁₈의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES (pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen Life Technology) 5 ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml HBSS용액으로 옮기고, 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 세포를 분산시켰다. 이후 분산된 세포의 밀도를 측정할 다음 B27을 첨가한 plating neurobasal me-

dia (Invitrogen Life Technology; 100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25 mM glutamate, 0.1 ml 25 mM 2-mercaptoethanol)에 약 1,500 cells/mm²가 되도록 집중하여 5% CO₂ 배양조에서 배양하였다. 2~3일 간격으로 배양액을 feeding neurobasal media (100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

저산소증 유발

Culture plate를 CO₂ Water Jacketed Incubator (Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂, 37°C 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

유전자표현 분석(microarray)을 위한 RNA 추출

배양 신경세포의 경우 DIV 14일 경에 가지돌기의 성장은 거의 완성되며, 이 시기에 왕성한 연결생성이 일어난다[29,36]. 한편 DIV 7 세포의 경우 glutamate, AMPA, 혹은 NMDA에 의한 흥분독성을 일으키지 않지만, DIV 14 세포는 심한 독성 반응을 일으킨다[29]. 따라서 본 연구에서는 DIV 12에 반하 2.5 µg/ml를 처리하고 DIV 14에 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나고 24 시간 후에 배양액을 제거하고 5~10 ml의 ice-cold PBS로 세척하였다. PBS를 제거하고 용액D [4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5%(w/v) sodium lauryl sarcosinate, 0.1 M β-mercaptoethanol] 1 ml를 각 culture dish에 넣어 세포를 용해시켰다. 용해된 lysate를 microfuge tube에 옮기고 tissue homogenizer로 15~30초간 균질화하였다. 여기에 용액D 1 ml 당 0.1 ml의 2 M sodium acetate (pH 4.0), 1 ml의 phenol (4°C), 0.2 ml의 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 섞어주었다. Tube를 얼음에 15분간 넣어둔 후 원심분리(10,000×g 20분, 4°C)하여 상등액을 취하고 동일 부피의 isopropanol을 넣어 잘 섞어주었다. 이를 -20°C에서 2시간 처리한 후 원심분리(10,000×g 30분, 4°C)하여 RNA를 침전시키고 용액D로 녹였다. 이를 isopropanol로 한 번 더 침전시킨 후 75% alcohol로 2회 세척한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리한 물에 녹이고 -70°C에 보관하였다.

Microarray

Microarray는 Digital Genomics (서울)에 의뢰하여 분석하였다. 대조군과 실험군의 저산소증 유발 세포에서 각각 분리한 20~50 µg의 total RNA로부터 oligo (dT) primer와 역전사 효소를 이용하여 first cDNA strand를 만들고, 대조군은 Cy3 dye (green)로, 실험군은 Cy5 dye (red)로 표지하였다. 두 probe를 1:1 혼합하여 TwinChip™ Rat-5K (Digital Genomics)을 hybridization (3X SSC, 42°C, 16시간)하고 최종적으로 0.1X SSC로 상온에서 1분씩 4회 세척하였다.

결과 및 고찰

저산소증에서 반하에 의한 유전자 표현의 변화

저산소증에서 반하의 신경세포 보호 기전을 알아보기 위하여 microarray 기법으로 반하가 유전자 표현에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에 사용한 흰쥐 대뇌신경세포는 저산소증 유발 후 3일 후부터 급격히 사망하기 시작한다. 따라서 저산소증 유발 후 3일 이전에 많은 유전자의 표현이 달라질 것으로 예상되어 1일째에 total RNA를 분리하였다. 즉, DIV 12의 배양세포에 반하 2.5 µg/ml를 처리하고 DIV 14에 저산소증을 유발하였으며, DIV 15에 세포로부터 guanidinium thiocyanate 방법으로 total RNA를 분리하였다. BioAnalyzer를 이용하여 RNA quality를 조사한 결과 대조군과 실험군 모두 rRNA ratio (28S/18S)가 2.0 이상으로 RNA 분해가 거의 일어나지 않은 매우 좋은 상태임을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Microarray 전문회사인 Digital Genomics (서울)에 의뢰하여 TwinChip™ Rat-5K microarray chip을 형광사진으로 분석하였다. 대조군의 cDNA는 Cy3 형광물질(green)로, 실험군은 Cy5 형광물질(red)로 표지하였으며, hybridization 결과 TwinChip의 upper array와 lower array의 형광이미지가 매우 유사하여 재현성이 높음을 알 수 있었다. MA plot에서 보면 $[M=\log_2(R/G), A=\{\log_2(R \times G)\}/2]$, 대부분의 M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 정도 이내의 증감을 나타내었다(Fig. 2). 이 가운데 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가

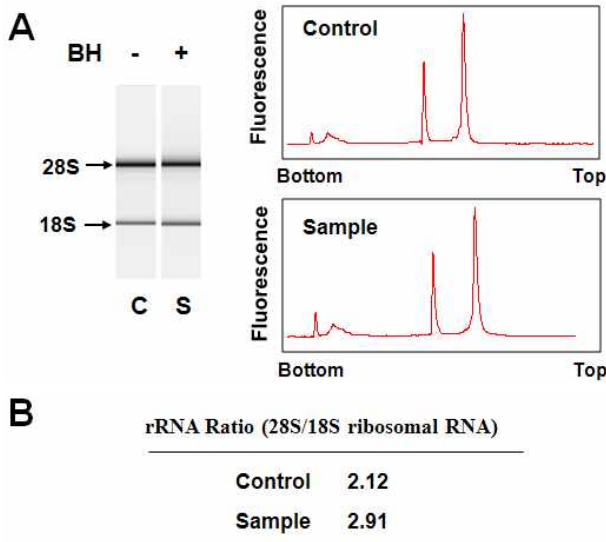


Fig. 1. Quality of isolated total RNA. Total RNA was isolated from Pr-treated and Pr-untreated cortical cultures at 24 hrs after hypoxic insult. Small aliquots of RNA preparations were subjected quality analysis by polyacrylamide gel electrophoresis and scanning at A260 (A) using a Bioanalyzer. The RNA quality was assessed by measuring 28S rRNA/18S rRNA ratios (B).

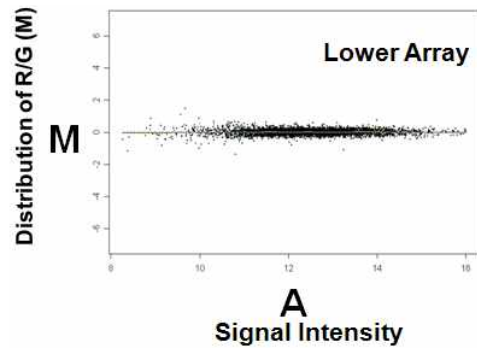


Fig. 2. MA plots. The y-axis indicate the R/G ratio $[M=\log_2(R/G)]$ and the x-axis signal intensities $[A=\{\log_2(R \times G)\}/2]$. Note that the M values of the majority of signals are between -0.5 and +0.5.

된 유전자는 530 여종, -0.2 이하 즉, 14% 이상 표현이 감소된 유전자는 524 여종이었다.

Apoptosis/cell death 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 반하에 의하여 표현이 변하는 apoptosis/cell death 관련 유전자 중 Global M 값이 ±0.2 이상 즉, ±14% 이상 표현이 증가된 유전자는 5종, 감소된 유전자는 15종이었다 (Table 1). Apoptosis 관련 유전자 중 arachidonate 12-lipoxygenase (*alox12*)는 약 30% (Global M=0.39)로 가장 많이 증가하였다. *alox12*는 세포분화와 세포사의 중요한 조절자로서 ROS의 일종인 ONOO⁻에 의한 신경세포의 자연사[56]와 glutathione 고갈 및 arachidonic acid에 의한 세포사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다[53]. 본 연구에서 세포사를 촉진하는 것으로 알려진 *alox12* 유전자가 많이 표현된 이유는 알 수 없다. Tubulin β5 (*tubβ5*)가 약 30% (Global M=0.38)로 두 번째로 많이 증가되었다. α-/β-tubulin heterodimer로 구성된 미세소관(microtubule)은 진핵세포에서 세포모양의 유지, 신호전달, 염색체 이동, mRNA 국소화, 축삭수송, 소기관의 자리매김, 그리고 소포 및 소기관의 이동 등 다양한 기능을 갖는다[13] 최근 proteasome 연구에 의하면 정상 상피세포에 비하여 식도편평세포암세포에서는 *tubβ5*를 포함한 15종의 단백질 표현이 증가하였다[41]. 이러한 결과들은 *tubβ5*가 세포의 분화, 성장 및 신호전달에 기여하는 단백질로서 저산소증에서 세포의 활성을 증가시키거나 세포 성장을 촉진하여 세포손상을 방지하는 것으로 해석된다. 다음은 Fas-associated factor 1 (*faf1* gene)로 약 27% (Global M=0.33)의 증가를 보였다. Mouse Faf1 (*mfaf1*)을 일시적으로 과표현시키면 L cell에서 Fas에 의한 세포 자연사를 촉진시키며[6], Human Faf1 (*hfaf1*)은 CK2에 의하여 serine 289 및 291에 인산화되며, hFAF1-CK2 complex 형성이 세포 자연사에서 증가한다[20,24]. 세포사를 촉진하는 것으로 알려진 *faf1*이 왜 저산소증에서 반하에 의하여 표현이 증가하는지는 알 수 없다. Transforming

Table 1. Apoptosis/cell death-related genes

Global.M	Gene. Symbol	Title	GenBank.ACC
0.387565	<i>alox12</i>	Arachidonate 12-lipoxygenase	AA924524
0.379533	<i>tubβ5</i>	Tubulin, beta 5	AA858888
0.330521	<i>faf1</i>	Fas-associated factor 1	AA957359
0.241613	<i>tgfa</i>	Transforming growth factor alpha	AI058602
0.219015	<i>mcl1</i>	Myeloid cell leukemia sequence 1	AA955239
-0.20987	<i>dap</i>	Death-associated protein	AA818903
-0.21851	<i>gsk3β</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	AA964758
-0.23015	<i>dedd</i>	Death effector domain-containing protein	AI029753
-0.25138	<i>ngfr</i>	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	AI500767
-0.25400	<i>mlh1</i>	Mismatch repair protein	AI137969
-0.25403	<i>c9</i>	Complement component 9	AA998796
-0.28606	<i>lcn2</i>	Lipocalin 2	AI137617
-0.30199	<i>pglyrp1</i>	Peptidoglycan recognition protein 1	AA875213
-0.30447	<i>dnase1l3</i>	Deoxyribonuclease I-like 3	AI044062
-0.38669	<i>vegf</i>	Vascular endothelial growth factor	AA924335
-0.40051	<i>hmx1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	AA874884
-0.40811	<i>gpx1</i>	Glutathione peroxidase 1	AA964788
-0.48572	<i>notch2</i>	Notch gene homolog 2, (Drosophila)	AA999021
-0.50495	<i>g6pdx</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	AA899102
-0.56459	<i>tieg</i>	TGFB inducible early growth response	AA858779

growth factor alpha 유전자(*tgfa*)는 약 19% (Global M=0.24)로, 네 번째로 많은 증가를 보였다. *tgfa*는 난모세포의 핵과 세포질의 성숙을 자극하고[43], 다양한 증배엽 및 외배엽 조직에 세포분열 효능이 있으며 강력한 혈관생성 인자인 것으로 알려져 있다[7]. 최근에는 *tgfa*가 nuclear factor-kappaB를 활성화시켜 c-Myc에 유도된 세포 자연사를 저해하는 것으로 밝혀졌다[3]. 따라서 저산소증에서 *tgfa*의 표현의 증가는 세포사를 억제하는데 도움이 될 것으로 이해된다. 약 17% (Global M=0.21)의 증가를 보인 Myeloid cell leukemia sequence 1 (*mcl-1*)은 Bcl-2 family의 antiapoptotic member로서[10], 세포분화나 세포사의 신호전달과정에서 유도되며[19], multiple myeloma cell과[12,16,55] B cell lymphoma cell의[30] 생존에 필수적이며, myeloma cell의 증식을 촉진시킨다[55]. *mcl-1*은 Bim과 같은 proapoptotic protein들과 대항하는 것으로 생각되어진다[18]. 따라서 *mcl-1* 표현의 증가는 저산소증에서 세포사를 억제하는데 도움이 될 것으로 이해된다. Apoptosis 유전자 그룹 가운데 Tgfb inducible early growth response 유전자 (*tieg*)는 약 45% (Global M=-0.56)로 가장 크게 발현이 감소하였다. 이 유전자는 간세포에서 산화적 스트레스 하에서 증가하여 세포 자연사를 매개하는 것으로 알려져 있고[44], pancreatic epithelial cells [44], hepatocyte line Hep 3B [44], 그리고 epithelial Mv1Lu cells [5]에서 세포 자연사를 유도하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 결과들은 *tieg* 단백질들이 항증식 및 세포 자연사를 유도하는 기능을 갖는 유전자 전사인자임을 의미한다. 따라서 반하에 의한 *tieg* 유전자의 표현 감소는 저산소증에서 세포사를 억제하는데 도움을 줄 것으로 이해된다.

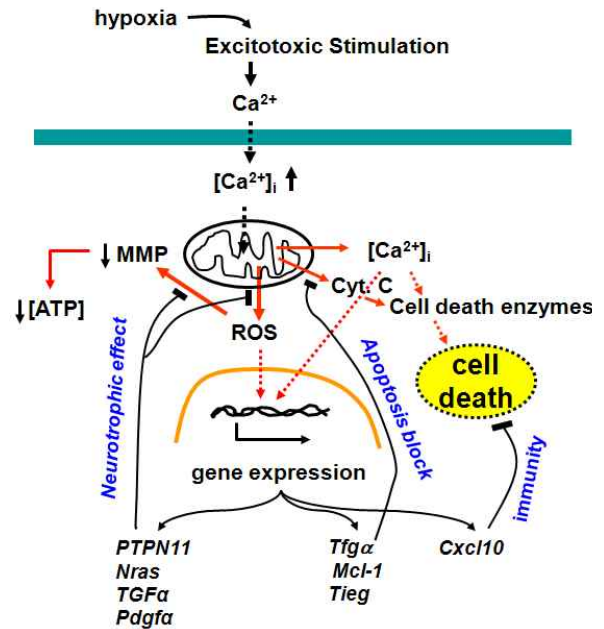


Fig. 3. Proposed mechanisms for neuroprotecting effects by Pr. Excitotoxic stimulation of neurons results in the influx of Ca^{2+} , which damages mitochondrial functions. High production of reactive oxygen species (ROS) by damaged mitochondria. In turn, ROS damages many important cellular molecules leading to cell death. The Pr up-regulates many genes that help survival of neurons in hypoxia such as antiapoptosis (*tgfa*, *mcl-1*, *tieg*), and immunity (*cxcl10*). Genes that have general neurotrophic effects may have alleviated ROS production and mitochondrial membrane potential (MMP) deprivation.

세포주기 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 반하에 의하여 표현이 변하는 세포주기 관련 유전자 중 12종류의 표현이 14% 이상 증가되었으며, 18종류는 감소되었다(Table 2). Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 유전자(*ptpn11*)는 약 47% (Global M=0.58)로 발현이 가장 많이 증가하였다. *ptpn11*에 의해 만들어 지는 non-receptor protein tyrosine phosphatase Shp2 (Src Homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase)는 growth factor, cytokine, 및 extracellular matrix receptor 에 신호를 주는 신호 유인 요소로서 세포의 증식과 분화, 이동에 중요한 역할을 한다. 뿐만 아니라 태아발생과 조혈에도 중요한 역할을 한다[51]. Neuroblastoma RAS viral (*v-ras*) oncogene homolog 유전자(*n-ras*)는 약 40 % (Global M=0.49)의 증가를 보였다. *n-ras* 유전자는 thyroid carcinomas와 myeloid leukemias 등에서 발견되며[30], *b-ras* 유전자와 *n-ras* 유전자는 cutaneous melanoma의 발병과 유지에 중요한 역할을 한다[1]. Platelet derived growth factor alpha 유전자(*pdgfa*)는

약 19% (Global M=0.23)의 증가를 보였다. *pdgfa* 유전자들은 중간엽 세포의 이동과 증식에 중요한 역할을 한다. Pdgf receptor/Pdgf system은 배 발생 과정에서 신장, 심혈관 계통, 폐, 뇌와 결합조직의 발생에 중요한 역할을 하며, 어른에서는 상처치유, 염증, 혈관신생에 중요한 역할을 한다. *pdgfa* 또는 *pdgfb* receptor tyrosine kinases의 활성화는 골수종에서 보여지고 *pdgfa*의 활성화는 위장관 종양에서 보여진다[26]. 따라서 *ptpn11*, *nras*, *pdgfa* 단백질들은 세포의 분화, 성장에 기여하는 단백질로 세포사를 방지하는 반하에서 증가하는 것은 저산소증에서 세포의 분화와 성장을 촉진하여 세포 손상을 방지하는데 도움을 줄 것으로 이해된다.

면역 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 반하에 의하여 표현이 변하는 면역 관련 유전자 중 10종류의 표현이 14% 이상 증가되었으며, 12종류는 감소되었다(Table 3). 이 가운데 *ca3d* 유전자가 가장 크게 증가되었다(Global M=0.66). *ca3b*와 *ca8*은 T-cell의 중요 세포표면단백

Table 2. Cell cycle-related genes

Global.M	Gene. Symbol	Title	GenBank.ACC
0.584726	<i>ptpn11</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	AA901405
0.494496	<i>nras</i>	Neuroblastoma RAS viral (<i>v-ras</i>) oncogene homolog	AA926321
0.372445	<i>ppp1a</i>	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	AA900570
0.305672	<i>nr2f6</i>	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	AA997437
0.275938	<i>nfib</i>	Nuclear factor I/B	AA997500
0.275039	<i>tsc2</i>	Tuberous sclerosis 2	AA899998
0.258189	<i>rgs2</i>	Regulator of G-protein signaling protein 2	AA858950
0.241613	<i>tgfa</i>	Transforming growth factor alpha	AI058602
0.226641	<i>pdgfa</i>	Platelet derived growth factor, alpha	AI137550
0.216562	<i>aurkb</i>	Aurora kinase B	AA996466
0.209644	<i>mycn</i>	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	AI072537
0.205755	<i>id2</i>	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	AA964507
-0.21821	<i>ccng1</i>	Cyclin G1	AA925280
-0.21851	<i>gsk3b</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	AA964758
-0.23319	<i>calm3</i>	Calmodulin 3	AA875357
-0.25400	<i>mlh1</i>	Mismatch repair protein	AI137969
-0.27355	<i>cdk4</i>	Cyclin-dependent kinase 4	AA819907
-0.27467	<i>ccnb1</i>	Cyclin B1	AA998164
-0.30750	<i>cdc25a</i>	Cell division cycle 25A	AI060206
-0.32151	<i>top2a</i>	Topoisomerase (DNA) 2 alpha	AA899114
-0.32623	<i>anxa1</i>	Annexin A1	AA964960
-0.32742	<i>vav1</i>	Vav 1 oncogene	AA925725
-0.36658	<i>cdc25b</i>	Cell division cycle 25B	AA858839
-0.38669	<i>vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor	AA924335
-0.39078	<i>par3</i>	Three-PDZ containing protein similar to C. elegans PAR3 (partitioning defect)	AI044473
-0.39233	<i>camk2d</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	AA925495
-0.39821	<i>ccnd1</i>	Cyclin D1	AA957218
-0.44485	<i>apc</i>	Adenomatous polyposis coli	AI058280
-0.48572	<i>notch2</i>	Notch gene homolog 2, (Drosophila)	AA999021
-0.50916	<i>erbB2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	AA858862

Table 3. Immune response-related genes

Global.M	Gene. Symbol	Title	GenBank.ACC
0.6618464	<i>cd3d</i>	CD3 antigen delta polypeptide	AI137921
0.4733848	<i>cxc10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	AI059907
0.3457336	<i>pawr</i>	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	AA956914
0.3440545	<i>pparg</i>	Peroxisome proliferator activated receptor, gamma	AI111890
0.2750392	<i>tsc2</i>	Tuberous sclerosis 2	AA899998
0.2416067	<i>cxc12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	AA925112
0.2283354	<i>azgp1</i>	Alpha-2-glycoprotein 1, zinc	AI059700
0.2122148	<i>cd5</i>	CD5 antigen	AA925584
0.2038110	<i>ptprc</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	AA924685
0.2029980	<i>ptms</i>	Parathymsin	AA899878
-0.2045649	<i>stat3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	AI045179
-0.2341147	<i>gal</i>	Galanin	AA955779
-0.2461116	<i>f2</i>	Coagulation factor 2	AI071305
-0.2540251	<i>c9</i>	Complement component 9	AA998796
-0.2939990	<i>gbp2</i>	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	AA819701
-0.3019932	<i>pglyrp1</i>	Peptidoglycan recognition protein 1	AA875213
-0.3122543	<i>hrh4</i>	Histamine H4 receptor	AA900657
-0.3173815	<i>igbp1</i>	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	AA997141
-0.3274247	<i>vav1</i>	Vav 1 oncogene	AA925725
-0.3352131	<i>c1qr1</i>	Lymphocyte antigen 68	AA818744
-0.3409484	<i>ahsg</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein	AA955349
-0.3757863	<i>β2m</i>	Beta-2 microglobulin	AA817792

Table 4. 'Response to stress'-related genes

Global.M	Gene. Symbol	Title	GenBank.ACC
0.5847257	<i>ptpn11</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	AA901405
0.4733848	<i>cxc10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	AI059907
0.3457336	<i>pawr</i>	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	AA956914
0.3440545	<i>ppary</i>	Peroxisome proliferator activated receptor, gamma	AI111890
0.2773206	<i>apex1</i>	Apurinic/aprimidinic endonuclease 1	AA900301
0.2750392	<i>tsc2</i>	Tuberous sclerosis 2	AA899998
0.2682003	<i>prkab1</i>	Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	AA924247
0.2038111	<i>ptprc</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	AA924685
-0.2045649	<i>stat3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	AI045179
-0.2185100	<i>gsk3β</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	AA964758
-0.2391784	<i>hmox2</i>	Heme oxygenase (decycling) 2	AI136539
-0.2458931	<i>aqp9</i>	Aquaporin 9	AA956051
-0.2461116	<i>f2</i>	Coagulation factor 2	AI071305
-0.2539960	<i>mlh1</i>	Mismatch repair protein	AI137969
-0.2540251	<i>c9</i>	Complement component 9	AA998796
-0.2551789	<i>defa</i>	Defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	AI045987
-0.2566247	<i>inexa</i>	Internein, alpha	AA875659
-0.2621680	<i>defb1</i>	Defensin beta 1	AA998504
-0.2778240	<i>txnrd2</i>	Thioredoxin reductase 2	AA925357
-0.2806847	<i>gmpr</i>	Guanosine monophosphate reductase	AI138122
-0.3122543	<i>hrh4</i>	Histamine H4 receptor	AA900657
-0.3315816	<i>pxpk1</i>	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	AI029841
-0.3352131	<i>c1qr1</i>	Lymphocyte antigen 68	AA818744
-0.3409484	<i>ahsg</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein	AA955349
-0.3710696	<i>becn1</i>	Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein)	AA858688
-0.3757863	<i>β2m</i>	Beta-2 microglobulin	AA817792
-0.4005125	<i>hmox1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	AA874884
-0.4081093	<i>gpx1</i>	Glutathione peroxidase 1	AA964788
-0.6153225	<i>mt3</i>	Metallothionein 3	AA924772

질이다. T-cell 활성화 동안, T-cell 수용체(TCR)/ $\alpha\beta$ 복합체와 결합하고 있는 major histocompatibility complex (MHC) class I 단백질에 $\alpha\beta$ 이 결합한다[39,52]. $\alpha\beta$ 복합체는 4개의 작은 펩티드 $\alpha\beta d$, $\alpha\beta e$, $\alpha\beta g$ 및 $\alpha\beta i$ 로 구성된다. $\alpha\beta$ 는 세포막 당단백질로서 T-cell의 발생, 갑상선세포(thymocyte)의 발생에 필수적인 역할을 한다[4,11]. 따라서 반하에 의한 CD3의 표현증가는 세포사를 방지하는데 도움을 줄 것으로 이해된다.

Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 유전자(*cxcl10*)는 약 38 % (Global M=0.47)로 많은 증가를 보였다. Chemokine은 면역세포들이 감염부위로 몰려들도록 조절을 하는데, 그 가운데 Cxcl10 chemokine은 Cxcr3 수용체를 활성화시키는 리간드이다. 한편 Cxcr3 수용체는 활성화 T 임파구와 natural killer cell에

서 표현되며 이들이 감염부위로 이동하는데 관여한다[27,34]. 또한 *cxcl10* 유전자는 광견병 virus에 감염시켰을 때 발현이 증가하며[41], mouse hepatitis virus를 뇌 내로 감염시킨 쥐에서도 발현이 증가한다[33]. *cxcl10* 유전자의 발현 증가는 저산소증 상태에서 면역과 관련된 반응을 통해 세포 손상을 방지하는데 도움을 줄 것으로 이해된다.

이 밖에도 스트레스 반응 관련 유전자는 8종이 14% 이상 표현이 증가되었으며, 21 종류는 14% 이상 감소되었고(Table 4), 유전자 전사(transcription) 관련 유전자 중 15종류의 표현이 14% 이상 증가되었으며, 22종류는 14% 이상 감소되었다(Table 5). 생리대사 관련 유전자는 111 종류의 표현이 14% 이상으로 증가하였다. 이 가운데 Global M 값이 0.4, 즉 32%

Table 5. Transcription-related genes

Global.M	Gene. Symbol	Title	GenBank.ACC
1.694084	<i>ic3</i>	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	AA818904
0.472195	<i>notch3</i>	Notch 3	AA875382
0.344055	<i>pparγ</i>	Peroxisome proliferator activated receptor, gamma	AI111890
0.305672	<i>nr2f6</i>	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	AA997437
0.304052	<i>msg1</i>	Melanocyte-specific gene 1 protein	AA924595
0.297030	<i>snrpb</i>	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	AI043856
0.282941	<i>madh7</i>	MAD homolog 7 (Drosophila)	AA901243
0.275938	<i>nfib</i>	Nuclear factor I/B	AA997500
0.256085	<i>madh4</i>	MAD homolog 4 (Drosophila)	AA997371
0.255638	<i>rab11a</i>	RAB11a, member RAS oncogene family	AA924941
0.244135	<i>mybbp1a</i>	MYB binding protein (P160) 1a	AA899306
0.229339	<i>deaf1</i>	Deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila)	AA997917
0.212937	<i>aes</i>	Amino-terminal enhancer of split	AA875427
0.209644	<i>mycn</i>	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	AI072537
0.202134	<i>pla2g6</i>	Phospholipase A2, group VI	AA964037
-0.20456	<i>stat3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	AI045179
-0.21851	<i>gsk3β</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	AA964758
-0.22667	<i>hoxa2</i>	Homeo box A2	AI070026
-0.22951	<i>gtf2b</i>	General transcription factor IIB	AA925106
-0.23015	<i>dedd</i>	Death effector domain-containing protein	AI029753
-0.24553	<i>fh12</i>	Four and a half LIM domains 2	AA997401
-0.26858	<i>rab11a</i>	RAB11a, member RAS oncogene family	AA963374
-0.27902	<i>myog</i>	Myogenin	AI030924
-0.29744	<i>khdrbs1</i>	Src associated in mitosis, 68 kDa	AA818199
-0.30694	<i>znf354a</i>	Zinc finger protein 354A	AA965012
-0.31248	<i>msx1</i>	Homeo box, msh-like 1	AI029934
-0.35064	<i>tulip1</i>	Tuberin-like protein 1	AI058970
-0.35200	<i>mtpn</i>	Myotrophin	AI044524
-0.36014	<i>lef1</i>	Lymphoid enhancer binding factor 1	AA858877
-0.36866	<i>tcf12</i>	Transcription factor 12	AI137908
-0.37265	<i>gtf2a2</i>	General transcription factor Iia 2	AA924402
-0.39413	<i>nr1h2</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	AA875128
-0.41069	<i>rps10</i>	Ribosomal protein S10	AA925325
-0.48572	<i>notch2</i>	Notch gene homolog 2, (Drosophila)	AA999021
-0.56534	<i>rlzfy</i>	Zinc finger protein Y1 (RLZF-Y)	AA925476
-0.74668	<i>foxq1</i>	HNF-3/forkhead homolog-1	AI030728
-0.78417	<i>hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	AA924800

이상 증가한 유전자는 18 종이었다. 반면에 14% 이상 감소하는 유전자는 157 종으로 이 가운데 Global M 값이 -0.4, 즉 32% 이하로 감소하는 유전자는 31 종이었다(Table 6). 신호전

달 관련 유전자는 28종류의 표현이 14% 이상 증가되었으며, 47 종은 감소되었다. 그 가운데 27종류는 Global M 값이 -0.3, 즉 23% 이상 감소되었다(Table 7).

Table 6. Physiological process-related genes

Global.M	Gene. Symbol	Title	GenBank.ACC
1.6940840	<i>id3</i>	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	AA818904
1.2395120	<i>enpp3</i>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	AA859670
1.0160570	<i>amacr</i>	Alpha-methylacyl-CoA racemase	AA818115
0.7467088	<i>syp</i>	Synaptophysin	AI136413
0.6618464	<i>cd3d</i>	CD3 antigen delta polypeptide	AI137921
0.6254410	<i>arpc1a</i>	Suppressor of profilin/p41 of actin-related complex 2/3	AA925238
0.5847257	<i>ptpn11</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	AA901405
0.5566112	<i>synj2bp</i>	Synaptojanin 2 binding protein	AA924552
0.4944955	<i>nras</i>	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	AA926321
0.4733848	<i>cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	AI059907
0.4721954	<i>notch3</i>	Notch 3	AA875382
0.4647567	<i>fgfr3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3	AA899336
0.4509178	<i>vps33a</i>	Vacuolar protein sorting 33A (yeast)	AA818125
0.4487636	<i>psnf7</i>	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	AA955256
0.4476190	<i>col1a2</i>	Procollagen, type I, alpha 2	AA819620
0.4441604	<i>bhmt</i>	Betaine-homocysteine methyltransferase	AA901407
0.4323224	<i>mdh1</i>	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	AA900573
0.4080350	<i>pace4</i>	Subtilisin - like endoprotease	AA956778
-0.4001608	<i>kcnc1</i>	Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 1	AA997380
-0.4005125	<i>hmox1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	AA874884
-0.4014610	<i>pcyt2</i>	Phosphate cytidylyltransferase 2, ethanolamine	AA924883
-0.4043514	<i>dio3</i>	Deiodinase, iodothyronine, type III	AA899312
-0.4057505	<i>dbi</i>	Diazepam binding inhibitor	AA925794
-0.4074900	<i>acox1</i>	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	AA924697
-0.4081093	<i>gpx1</i>	Glutathione peroxidase 1	AA964788
-0.4106869	<i>rps10</i>	Ribosomal protein S10	AA925325
-0.4122073	<i>nup107</i>	Nuclear pore complex protein	AI070849
-0.4245674	<i>ptbp1</i>	Polypyrimidine tract binding protein 1	AA818247
-0.4277233	<i>arg2</i>	Arginase 2	AI045467
-0.4300170	<i>otc</i>	Ornithine transcarbamylase	AA858770
-0.4448516	<i>apc</i>	Adenomatosis polyposis coli	AI058280
-0.4578769	<i>arl4</i>	ADP-ribosylation-like 4	AI145407
-0.4857154	<i>notch2</i>	Notch gene homolog 2, (Drosophila)	AA999021
-0.5001491	<i>cyp2d26</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	AI030897
-0.5047123	<i>csnk1a1</i>	Casein kinase 1, alpha 1	AI030720
-0.5049452	<i>g6pdx</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	AA899102
-0.5091557	<i>erbB2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	AA858862
-0.5645942	<i>tieg</i>	TGFB inducible early growth response	AA858779
-0.5653405	<i>rlzfy</i>	Zinc finger protein Y1 (RLZF-Y)	AA925476
-0.5691750	<i>atp5b</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	AI146173
-0.5917287	<i>bckd1hb</i>	Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	AA925943
-0.6153225	<i>mt3</i>	Metallothionein 3	AA924772
-0.6306819	<i>pim3</i>	Serine threonine kinase pim3	AA997031
-0.6930955	<i>pxmp3</i>	Peroxisomal membrane protein 3	AI043801
-0.7017341	<i>IOC64300</i>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthase	AA956998
-0.7466824	<i>foxq1</i>	HNF-3/forkhead homolog-1	AI030728
-0.7841654	<i>hmgcs1</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	AA924800
-1.0800060	<i>ech1</i>	Enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	AA926032
-1.3143080	<i>igf2r</i>	Insulin-like growth factor 2 receptor	AA900892

Table 7. Signal transduction-related genes

Global.M	Gene. Symbol	Title	GenBank.ACC
0.6618464	<i>cd3d</i>	CD3 antigen delta polypeptide	AI137921
0.5847257	<i>ptpn11</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	AA901405
0.5566112	<i>synj2bp</i>	Synaptojanin 2 binding protein	AA924552
0.4944955	<i>nras</i>	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	AA926321
0.4733848	<i>cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	AI059907
0.4721954	<i>notch3</i>	Notch 3	AA875382
0.4647567	<i>fgfr3</i>	Fibroblast growth factor receptor 3	AA899336
0.4080350	<i>pace4</i>	Subtilisin - like endoprotease	AA956778
0.3457336	<i>pawr</i>	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	AA956914
0.3297138	<i>pdgfra</i>	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	AA925099
0.3279819	<i>mpdz</i>	Multiple PDZ domain protein	AA925078
0.3064598	<i>mt1a</i>	Metallothionein	AA900218
0.3023251	<i>mel</i>	Mel transforming oncogene (derived from cell line NK14)- RAB8 homolog	AA819532
0.2888761	<i>gprk2l</i>	G protein-coupled receptor kinase 2, groucho gene related (Drosophila)	AA963235
0.282941	<i>madh7</i>	MAD homolog 7 (Drosophila)	AA901243
0.2760824	<i>minpp1</i>	Multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1	AI071438
0.2750392	<i>tsc2</i>	Tuberous sclerosis 2	AA899998
0.2674113	<i>adru1d</i>	Adrenergic receptor, alpha 1d	AA924076
0.2581894	<i>rgs2</i>	Regulator of G-protein signaling protein 2	AA858950
0.2560848	<i>madh4</i>	MAD homolog 4 (Drosophila)	AA997371
0.2556378	<i>rab11a</i>	RAB11a, member RAS oncogene family	AA924941
0.2471418	<i>arl1</i>	ADP-ribosylation factor-like 1	AI044423
0.2294907	<i>argbp2</i>	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2	AI058393
0.2171982	<i>gpr56</i>	G protein-coupled receptor 56	AA819206
0.2129373	<i>aes</i>	Amino-terminal enhancer of split	AA875427
0.2122148	<i>cd5</i>	CD5 antigen	AA925584
0.2046275	<i>rgs14</i>	Regulator of G-protein signaling 14	AI071860
0.2038110	<i>ptprc</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	AA924685
-0.3012858	<i>gru.15</i>	Guanine nucleotide binding protein, alpha 15	AI045065
-0.3026250	<i>ppap2a</i>	Phosphatidate phosphohydrolase type 2a	AA818593
-0.3122543	<i>hrh4</i>	Histamine H4 receptor	AA900657
-0.3173815	<i>igbp1</i>	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	AA997141
-0.3180748	<i>dgka</i>	Diacylglycerol kinase, alpha (80 kDa)	AA818373
-0.3253093	<i>cmkor1</i>	Chemokine orphan receptor 1	AA997721
-0.3262285	<i>anxa1</i>	Annexin A1	AA964960
-0.3274084	<i>cacna1a</i>	Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	AI045770
-0.3274247	<i>vav1</i>	Vav 1 oncogene	AA925725
-0.3315816	<i>pxpk1</i>	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	AI029841
-0.3335970	<i>alcam</i>	Activated leukocyte cell adhesion molecule	AA875360
-0.3409484	<i>ahsg</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein	AA955349
-0.3461239	<i>git1</i>	G protein-coupled receptor kinase interactor 1	AA997450
-0.3558641	<i>prkar2a</i>	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, alpha	AA925274
-0.3601354	<i>lef1</i>	Lymphoid enhancer binding factor 1	AA858877
-0.3644576	<i>celsr3</i>	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	AI029122
-0.3672277	<i>rab26</i>	RAB26, member RAS oncogene family	AI030702
-0.3750298	<i>sdcbp</i>	Syntenin	AA818429
-0.3866872	<i>vegf</i>	Vascular endothelial growth factor	AA924335
-0.3907754	<i>par3</i>	Three-PDZ containing protein similar to C. elegans PAR3 (partitioning defect)	AI044473
-0.4005125	<i>hmx1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	AA874884
-0.4448516	<i>apc</i>	Adenomatosis polyposis coli	AI058280
-0.4528926	<i>bmp2</i>	Bone morphogenetic protein 2	AI070931
-0.4578769	<i>arl4</i>	ADP-ribosylation-like 4	AI145407
-0.4857154	<i>notch2</i>	Notch gene homolog 2, (Drosophila)	AA999021
-0.5047123	<i>csn1a1</i>	Casein kinase 1, alpha 1	AI030720
-0.5091557	<i>erb2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	AA858862

요 약

본 연구는 저산소증에서 반하가 대뇌신경세포의 유전자 표현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양한 E18의 흰쥐 대뇌 신경세포를 반하로 처리하고, 저산소증을 유도한 후 microarray 기법으로 유전자 표현 변화를 조사하였다. Microarray 결과 *tubb5*, *tgfb*, *ptpn11*, *n-ras*, *pdgfa* 등 세포의 성장 분화에 관여하는 유전자들의 표현이 증가하였으며, 세포 자연사를 억제하는 *mcl-1* 유전자의 표현 또한 증가하였다. 한편 세포 자연사를 유도하는 *tieg* 유전자는 표현이 감소하였다(Fig. 3). 반하에 의하여 수많은 유전자의 표현이 변화되었고, 세포사를 촉진하는 유전자의 표현이 크게 증가되는 경우(예, *alox12*, *faf1*)도 있어 본 연구결과만으로 일반적인 결론을 유도하기는 어려웠다. 그러나 대략적으로 반하는 저산소증에서 주로 세포의 성장과 분화를 유지하고, 세포 자연사를 방지하는 유전자들의 표현을 증가시켜 신경 세포사를 보호하는 것으로 이해된다.

References

- Akslen, L. A., S. Angelini, O. Straume, I. M. Bachmann, A. Molven, K. Hemminki, and R. Kumar. 2005. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 312-317.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege, and P. J. Price. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* **35**, 567-676.
- Cavin, L. G., F. Wang, V. M. Factor, S. Kaur, M. Venkatraman, S. S. Thorgeirsson, and M. Arsur. 2005. Transforming growth factor-alpha inhibits the intrinsic pathway of c-Myc-induced apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in murine hepatocellular carcinomas. *Mol. Cancer Res.* **3**, 403-412.
- Chaloux, E., T. Lopez-Rovira, J. L. Rosa, G. Pons, L. M. Boxer, R. Bartrons, and F. Ventura. 1999. A zinc-finger transcription factor induced by TGF-beta promotes apoptotic cell death in epithelial Mv1Lu cells. *FEBS Lett.* **457**, 478-482.
- Chee, M., R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris, and S. P. Fodor. 1996. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* **274**, 610-614.
- Chu, K., X. Niu, and L. T. Williams. 1995. A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11894-11898.
- Cirelli, C. and G. Tononi. 1999. Differences in brain gene expression between sleep and waking as revealed by mRNA differential display and cDNA microarray technology. *J. Sleep Res.* **8**, S44-S52.
- Coffey, R. J., R. Derynck, and J. N. Wilcox. 1987. Production and autoinduction of transforming growth factor in human keratinocytes. *Nature* **28**, 817-820.
- Coultas, L. and A. Strasser. 2003. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol.* **13**, 115-123.
- Dadi, H. K. A. J. Simon, and C. M. Roifman, 2003. Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1821-1828.
- Dave, V. P., Z. Cao, C. Browne, B. Alarcon, G. Fernandez-Miguel, J. Lafaille, A. de la Hera, S. Tonegawa, and D. J. Kappes. 1997. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage, *EMBO.* **16**, 1360-1370.
- Derenne, S., B. Monia, N. M. Dean, J. K. Taylor, M. J. Rapp, J. L. Harousseau, R. Bataille, and M. Amiot. 2002. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* **100**, 194-199.
- Dutcher, S. K. 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 49-54.
- Ebert, B. L., J. D. Firth, and P. J. Ratcliffe. 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* **270**, 29083-29089.
- Fuh, Jr., S. J. Wang, E. B. Larson, and H. C. Liu. 1996. Prevalence of stroke in kinmen. *Stroke* **27**, 1338-1341.
- Gojo, I., B. Zhang, and R. G. Fenton. 2002. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl1. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3527-3538.
- Goldberg, M. A., S. P. Dunning, and H. F. Bunn. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* **242**, 1412-1415.
- Gomez-Bougie, P., R. Bataille R, and M. Amiot. 2004. The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3156-3164.
- Good, L., G. P. Dimri, J. Campisi, and K. Y. Chen. 1996. Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence. *J. Cell Physiol.* **168**, 580-588.
- Guerra, B., B. Boldyreff, and O. G. Issinger. 2001. FAS-associated factor 1 interacts with protein kinase CK2 in vivo upon apoptosis induction. *Int. J. Oncol.* **19**, 1117-1126.
- Haddad, J. J. and S. C. Land. 2000. O₂-evoked regulation of HIF-1a and NFκB in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **278**, L492-L503.
- Hoe, J. 1999. Dong-Eui-Bo-Gam. pp. 965, 961, 1955, Byuinmoonhwasa, Seoul.
- Hochachka, P. W. and Lutz P. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol. B Biochem Mol. Biol.* **130**, 435-459.
- Jensen, H. H., M. Hjerrild, B. Guerra, M. R. Larsen, P. Hojrup, and B. Boldyreff. 2001. Phosphorylation of the Fas associated factor FAF1 by protein kinase CK2 and identi-

- fication of serines 289 and 291 as the in vitro phosphorylation sites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 577-589.
25. Ji, H. J. and S. I. Lee. 2007. *Hanyack-Gyugyuk-Juha*. pp. 513, Korean index Co., Seoul.
 26. Jones, A. V. and N. C. Cross. 2004. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2912-2923.
 27. Kim, C. H. and H. E. Broxmeyer. 1999. SLC/exodus2/6Ckine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation. *J. Leukoc Biol.* **66**, 455-461.
 28. Kim, H. C. 2001. Pharmacology of Korea. pp. 346-347, Jipmoondang, Seoul.
 29. King, A. E., R. S. Chung, J. C. Vickers, and T. C. Dickson. 2006. Localization of glutamate receptors in developing cortical neurons in culture and relationship to susceptibility to excitotoxicity. *J. Comp. Neurol.* **498**, 277-294.
 30. Kroll, T. G. Molecular events in follicular thyroid tumors. 2004. *Cancer Treat Res.* **122**, 85-105.
 31. Levy, A. P., N. S. Levy, S. Wegner, and M. A. Goldberg. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **270**, 13333-13340.
 32. Liang, P. and A. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
 33. Liu, M. T., H. S. Keirstead, and T. E. Lane. 2001. Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *J. Immunol.* **167**, 4091-4097.
 34. Luster, A. 1998. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* **228**, 436-445.
 35. Michels, J., J. W. O'Neill, C. L. Dallman, A. Mouzakiti, F. Habens, M. Brimmell, K. Y. Zhang, R. W. Craig, E. G. Marcusson, P. W. Johnson, and G. Packham. 2004. Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* **23**, 4818-4827.
 36. Mundy, W. R., B. Robinette, N. M. Radio, and T. M. Freudenrich. 2008. Protein biomarkers associated with growth and synaptogenesis in a cell culture model of neuronal development. *Toxicology* **30**, 249(2-3):220-229.
 37. Nijijima, A, Y. Okui, M. Kubo, M. Higuchi, H. Taguchi, H. Mitsuhashi, and M. Maruno. 1993. Effect of pinellia tuber on the efferent activity of gastric vagus nerve in the rat. *Brain Res Bull.* **32**, 103-136.
 38. Nilsson, G. E. 2001. Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol. Sci.* **16**, 217-221.
 39. Norment, A. M., R. D. Salter, P. Parham, V. H. Engelhard, and D. R. Littman. 1988. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* **336**, 79-81.
 40. Prabhakar, N. R. and J. L. Overholt. 2000. Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Respir. Physiol.* **122**, 209-221.
 41. Prehaud, C., F. Megret, M. Lafage, and M. Lafon. 2005. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J. Virol.* **79**, 12893-12904.
 42. Qi, Y., J. F. Chiu, L. Wang, D. L. Kwong, and Q. Y. He. 2005. Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics* **5**, 2960-2971.
 43. Reeka, N., F. D. Berg, and C. Brucker. 1998. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum Reprod* **13**, 2199-2205.
 44. Ribeiro, A., S. F. Bronk, P. J. Roberts, R. Urrutia, and G. J. Gores. 1999. The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* **30**, 1490-1497.
 45. Schena, M., D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P. O. Brown, and R. W. Davis. 1996. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10614-10619.
 46. Semenza, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 588-594.
 47. Semenza, G. L. 1999. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 551-578.
 48. Semenza, G. L., B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concordet, P. Maire, and A. Giallongo. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529-32537.
 49. Semenza, G. L., P. H. Roth, H. M. Fang, and G. L. Wang. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **269**, 23757-23763.
 50. Tachibana, I., M. Imoto, P. N. Adjei, G. J. Gores, M. Subramaniam, T. C. Spelsberg, and R. Urrutia. 1997. Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 2365-2374.
 51. Tartaglia, M. and B. D. Gelb. 2005. Germ-line and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Eur. J. Med. Genet.* **48**, 81-96.
 52. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, and J. B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* **55**, 301-308.
 53. Wang, H. J. Li, P. L. Follett, Y. Zhang, D. A. Cotanche, F. E. Jensen, J. J. Volpe, and P. A. Rosenberg. 2004. 12-Lipoxygenase plays a key role in cell death caused by glutathione depletion and arachidonic acid in rat oligodendrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 2049-2058.
 54. Yoon, J. S., J. C. Seo, and S. W. Han. 2006. Pinelliae Rhizoma herbal-acupuncture solution induced apoptosis in human cervical cancer cells, SNU-17. *Am. J. Chin. Med.* **34**, 401-408.

55. Zhang, B., I. Gojo, and R. G. Fenton. 2002. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood* **99**, 1885-1893.
56. Zhang, Y., H. Wang, J. Li, D. A. Jimenez, E. S. Levitan, E. Aizenman, and P. A. Rosenberg. 2004. Peroxynitrite-induced neuronal apoptosis is mediated by intracellular zinc release and 12-lipoxygenase activation. *J. Neurosci.* **24**, 10616-10627.
57. Zhu, Y. P. 1998. *Chinese Materia Medical Chemistry, Pharmacology and Application*. pp. 477-479, Harwood Academic Publisher, The Netherlands.