

Original article

## Microarray를 이용한芍藥의 인간치은섬유모세포 유전자 발현 조절 연구

김경호<sup>1</sup>, 최영곤<sup>1,2</sup>, 홍연미<sup>2,3</sup>, 여수정<sup>2,3</sup>, 최지훈<sup>2,3</sup>, 김영홍<sup>4</sup>, 이제현<sup>5</sup>, 임사비나<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 대학원 한방응용의학과, <sup>2</sup>경희대학교 동서의학연구소,

<sup>3</sup>경희대학교 대학원 기초한의과학과, <sup>4</sup>일월한의원 구강건강연구소,

<sup>5</sup>동국대학교 한의과대학 본초학교실

### Gene expression microarray analysis of *Paeoniae radix* on IL-1 $\beta$ -stimulated primary human gingival fibroblast

Kyung-Ho Kim<sup>1</sup>, Yeong-Gon Choi<sup>1,2</sup>, Yeon-Mi Hong<sup>2,3</sup>, Sujung Yeo<sup>2,3</sup>,  
Ji-Hoon Choi<sup>2,3</sup>, Young-Hong Kim<sup>4</sup>, Je-Hyun Lee<sup>5</sup>, Sabina Lim<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Applied Eastern Medicine, Grad. School, Kyung Hee University,

<sup>2</sup>WHO Collaborating Ctr. for Traditional Medicine, East-West Med. Res. Institute,

<sup>3</sup>Dept. of Basic Eastern Medical Science, Grad. School, Kyung Hee University,

<sup>4</sup>Institute for Oral Health, IL-WOL Oriental Medicine Clinic,

<sup>5</sup>Dept. of Herbology, Col. of Eastern Medicine, Dongguk University, Gyeongju, Republic of Korea

**Background & Objective:** The aim of this study was to investigate the effect of *P. radix* on the inflammatory related gene expression in IL-1 $\beta$ -stimulated primary human gingival fibroblast using Whole Transcript Sense Target (WT-ST).

**Method:** Human gingival fibroblast was incubated with *P. radix* [100 or 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ], and IL-1 $\beta$  [1ng/ml] added an hour later. After 24h, total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit and the whole gene expression patterns were performed using WT-ST Labeling Assay<sup>®</sup>.

**Result:** In the DEG results, 782 genes were up-regulated in the IL-1 $\beta$ -treated group as compared to control and among those, 43 genes were associated with inflammation. 981 genes were down-regulated after treatment with IL-1 $\beta$  and of those 7 genes were associated with inflammation. 1439 genes were up-regulated after treatment with *P. radix* plus IL-1 $\beta$ -treated when compared to IL-1 $\beta$ -treated alone group and 1225 genes were down-regulated in the same condition. Among the down-regulated genes, 5 were associated with inflammation- and inhibitor genes such as GDF15 and LIF. In the analysis of the *P. radix* plus IL-1 $\beta$ -treated group, the most significant pathways were the cytokine-cytokine receptor interaction, toll-like receptor signaling, JAK-STAT signaling and tyrosine metabolism. The gene expression patterns in the *P. radix* 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  plus IL-1 $\beta$ -treated group appear to be more involved in the metabolism-related pathways than in the 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  plus IL-1 $\beta$ -treated group.

**Conclusion & Discussion:** By microarray analysis of gene expression data, we are able to identify gene expression patterns associated with not only anti-inflammation effect but also transcription function of *P. radix*.

*Key Words* : *Paeoniae radix*, human gingival fibroblast, microarray, IL-1 $\beta$ , anti-inflammation, cytokine

• Received : 11 January 2010      • Revised : 25 February 2010      • Accepted : 25 February 2010

• Correspondence to : 임사비나(Sabina Lim)

서울시 동대문구 회기동 경희대학교 대학원 한방응용의학과

Tel : +82-2-961-0324, Fax : +82-2-961-7831, E-mail : lims@khu.ac.kr

서론

芍藥 (*Paeoniae radix*)은 *Paeonia lactiflora*의 뿌리로 性味가 苦寒하고 주로 肝經血分에 들어가 血分の 實熱을 淸熱시키고, 瘀血滯滯를 善散하여 涼血祛瘀하는 대표적인 약재로 淸熱涼血, 散瘀止痛하는 효능이 있어 溫毒發癩, 吐血衄血, 目赤腫痛, 肝鬱脇痛, 經閉痛經, 癥瘕腹痛, 跌仆損傷, 癰腫瘡瘍 등의 血熱과 血瘀의 症에 응용하여 치료 한다<sup>1)</sup>. 東醫寶鑑에서는 瘀血痛의 처방으로, 芍藥이 포함된 瀉胃湯을 기술하면서 그 효능으로 胃熱과 瘀血로 인한 牙痛에 효과가 있고<sup>2)</sup> 活血祛瘀의 작용과 함께 통증을 억제하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 芍藥의 주요성분으로는 paeoniflorine, paeonin, paeonol, oxypaeoniflorine, albiflorine, 정유, 그리고 triterpenoids 화합물 등이 알려져 있다<sup>3)</sup>. 특히, 그 중에서 paeoniflorine류의 화합물을 비롯한 총 배당체 (Total Glycoside of *Paeoniae radix*, TGP)는 관절염을 유발시킨 흰쥐에서 뼈 조직의 파괴와 IL-1 $\beta$ , PEG2, TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하여 2 차적인 염증반응의 진행을 제제하고<sup>4)</sup> Collagen 으로 유도된 관절염에서 관절손상을 억제하는 활성 등이 보고되었다<sup>5)</sup>. 또한 芍藥의 알코올 분획 추출 성분은 동물실험에서 albumin, formaldehyde로 유발된 급성 족척종창에 유의한 효과를 나타내었다<sup>6)</sup>. TGP는 면역반응에 대해 양방향 조절작용을 가지고 있는데, CyclosporinA의 T helper (Th) cell의 억제와 levamisole의 T suppressor (Ts) cell 생성억제에 대한 길항작용이 있으며, Th/Ts의 비율을 조절함으로써 cyclophosphamide (Cy)의 DTH 및 비장세포의 SRBC용혈소의 생성을 억제하는 작용과 Cy에 의해 유발된 DTH의 활성화작용에 대한 길항작용이 있다<sup>6)</sup>.

치주염 (Periodontitis)은 치아를 둘러싼 지지조직에 염증이 생긴 것으로 치태 (microbial plaque)내에 세균이나 독소에 의한 만성 염증성 질환이며, 관용어로는 흔히 풍치라고 한다. 치주염의 초기증상은 대부분 자각증상이 없이 진행되다가 시간이 지남에 따라 잇몸 (치은)이 빨개지거나 통증이 있고 치아가

시리거나 흔들리며 아프고 냄새가 나기도 한다<sup>7)</sup>. 치료 및 예방으로서는 치태를 제거하고 염증의 원인인 세균을 없애주며 치주조직의 형태를 회복시키는 것이다. 이에 반해 치은염 (Gingivitis)은 잇몸에 염증이 생기는 질환으로서 방치해 두면 치주염으로 진행되는 일이 많은데, 치은염의 단계에서는 이가 흔들리지 않기 때문에 치주염과는 구별이 되며 대개 40대 이후에 많이 발생한다.

구강에서는 보통 30종이상의 세균이 사는데 그중 치주염과 관련 있다고 알려진 병인균은 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola* 등이다<sup>8,9)</sup>. 이러한 원인균이 밝혀짐에 따라 치주원인균에 대한 항생제 및 항균제의 연구가 수십 년간 이루어져 왔는데 최근에는 세균에 의한 치주조직의 감염과 이에 따른 숙주의 면역반응이 치주염에 더 중요할 것으로 생각되어 치주염과 관련된 면역에 대해서 연구가 활발하게 진행되고 있다. 치주염의 약물치료에 대한 연구로는 화학제제를 이용한 항생제, 항균제 및 항염제 등에 대하여 꾸준하게 있어왔다<sup>10,11)</sup>. 그러나 내성균의 발현, 과민반응, 위장장애, 치아 표면 착색, 박리성 치은염 유발 등의 부작용 때문에<sup>12,13)</sup> 현재 임상에서 사용되는 방법들은 치석제거술, 치근면 활택술, 치주판막술 등 기계를 이용해서 치료하는 수준에 머물고 있는 형편이다. 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 부작용이 적고 내성균이 생기지 않는 한약제제 개발에 대한 연구가 진행되어왔는데, 그 예로, 후박에서 추출한 magnolol 과 honokiol<sup>14)</sup>, 옥수수 불검화 추출물<sup>15)</sup>, 후박 및 은행엽 추출물<sup>16)</sup>, 백두옹 추출물<sup>17)</sup>, 천연의 *Curcuma xanthorrhiza* oil<sup>18)</sup>, 오배자, 파고지 추출물<sup>19)</sup> 등이 있으며 이러한 약물들은 주로 항균, 항염 효과 및 세포 활성도를 높이는 것으로서 치은 섬유 모세포에 영향을 미친다고 보고되어 있다.

세포의 기질단백분해효소 (Matrix metalloproteinases : MMP)는 정상적인 생물학적 성장과정, 배발생, 착상, 기관형성, 상처치유, 혈관형성, 세포사멸 등에 관여 할 뿐만 아니라, 암, 신경성 질환, 간경화 등의

다양한 병적과정에도 관여하는 것으로 밝혀졌다<sup>20,21)</sup>. 척추동물에서의 MMP는 20여종으로, 일차구조 domain motifs가 서로 다르게 구성되어있고 아연 (Zinc)분자를 함유하고 있으며 분해대상과 화학적 구조에 따라 여러 가지 subgroup, Collagenases (MMP-1,-8,-13) Gelatinases (MMP-2,-9), Stromelysins (MMP-3,-10, -11), membrane bound group (MMP-14, -15, -16, -17), matrilysin (MMP-7), metalloelastase (MMP-12)으로 구분된다. 기질단백분해효소의 활성화는 세포외적으로 조절 할 수 있으며 자연적인 억제인자인 특이성 단백질분해효소 억제인자 (Tissue specific Inhibitors of Matrix metalloproteinase; TIMP)와의 상호 작용에 의해서 조절된다<sup>22)</sup>. 치주인대 및 치은섬유모세포에 의해 생성되는 Type I 및 III 교원질은 치주조직에서 가장 우세한 세포외기질성분인데 치주염은 이러한 교원질이 분해가 되는 것으로서 기질단백분해효소에 의한다. 그중에서 MMP-1과 MMP-3는 치주염 발생에 관여하는 것으로 알려져 있는데, MMP-1은 Type I, II, III 교원질의 helix를 제한적으로 분열시켜 분해를 개시하고 gelatinase와 stromelysin에 의해 추가적인 분해가 진행이 되며 MMP-3는 Type IV와 IX 교원질 등을 분해하고 성인형 치주염에서 proMMP-8과 -9를 활성화 시키는 것으로 보고되고 있다<sup>23)</sup>. MMP 발현의 증가는 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 cytokine에 의해 유발되는데 치은모섬유세포로부터 분비된 IL-1 $\beta$ 에 의해 치주염을 심화시키며<sup>24)</sup> Cytokine 중에서 IL-6는 만성치주염환자의 치은 열구액에서 활성이 되어서 치주염에 중요한 역할을 한다<sup>25)</sup>.

본 연구에서 사용된 인간치은섬유모세포는 치은 결합조직 내에 나타나는 세포들 중 약 65%를 차지하며 여러 섬유들을 생성하고 무정형 세포간질인 당단백질이나 glycosaminoglycan 및 단백질도 생성한다. 세포의 형태는 방추형 또는 성상형이며 중앙에 난원형태의 핵을 가지고 있고 성장이 끝난 치은조직에서는 세포가 휴지기에 놓이지만 조직에 손상, 염증 등, 외부자극이 있으면, 세포기능이 다시 활발해져서 각종 교원섬유 및 DNA, 단백질 등을 생성하여

손상된 결합조직 성분을 구성한다. 외부 자극에 의한 염증손상이 없다면 세포는 다시 휴지기에 들어간다<sup>26)</sup>.

본 저자는 현대 분자생물학 및 생체정보학의 발달로 얻어진 유전자칩과 그 분석기술을 이용하여 염증 유발된 인간치은섬유모세포에서 항염증기전과 관련된 芍藥이 미치는 영향을 알아보고자 한다. 약의 항염증기전과 관련된 유전자의 발현 패턴을 분석하고 clustering 하여 공통 pathway를 찾아내는 데에 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 인간치은섬유모세포

제3대구치 발치를 위하여 경희대학교 치과병원에 내원한 환자에게서 환자 동의하에 발치와 함께 주위의 치은을 절제하여 Chang 에 의한 방법으로 실시하였다<sup>27,28)</sup>. 절제한 치은은 40% 소의 혈청 (fetal bovine serum[FBS], Gibco Co., Grand Island, NY, USA)과 20% 항생제 (penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, Gibco Co., Grand Island, NY, USA)가 첨가된  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM, L-glutamine 포함, Gibco Co., Grand Island, NY, USA)에서 3회 세척하였다. 세척된 치은 조직을 60mm Petri dish로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 scalpel 두 개를 이용하여 1mm<sup>2</sup>로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘 펴놓은 후 pipette을 이용하여 각 dish 당 2ml의 배양액을 주입하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 100% 배양기 (Shel-Lab, USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 1% 항생제를 첨가한  $\alpha$ -MEM을 사용하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배지를 교환하였다. Petri dish당 2ml씩 놓고 3분간 bench상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용하여 HBSS로 2

회 세척한 후 배양액을 넣고 세포 부유액을 만들어 60mm petri dish에 분주하였다. 세포가 70% 가량 자랐을 때 trypsin으로 처리해서 100mm petri dish에 다시 분주하였으며 5~6 passage되는 것을 본 실험에 사용하였다.

## 2. 시료의 제조 및 구입

본 실험에 사용한 芍藥 (*Paeoniae radix*)은 중국 산 *Paeonia lactiflora*의 뿌리를 거피하지 않고 건조한 것을 시중 (임수훈 약사업, 서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 약재 250g에 70% 에탄올 1000ml을 가하여 2회 환류 추출하였으며, 얻어진 추출액은 다시 농축하여 동결 건조시켰다. 동결건조 분말 (최종산물, 수득률 24%)을 DMSO에 녹여 최종 농도 20mg/ml로 실험에 사용하였다. Human recombinant IL-1β는 R&D system Inc. (Minneapolis, USA)에서 구입하여 최종농도 1ng/ml로 사용하였다.

## 3. 芍藥의 세포독성 및 치주염관련 유전자 발현 억제 실험

芍藥의 최적 약효 농도 검색과 치주염에 대한 유효성을 확인하기위해 계대배양 후 6 passage 되는 치은섬유 모세포에 芍藥을 첨가한 후 methyl tetrazolium salt (MTS)에 의한 cell viability assay kit (Cell Titer 96Aqueous nonradioactive Cell Proliferation assay kit, Promega, USA)를 사용하여 ELISA leader에서 490nm의 흡광도를 측정하였다. 세포를 4×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 각 well 당 분주하고 80% 가량 자랐을 때 芍藥을 농도별로 (10, 50, 100, 200, 500μg/ml) 첨가 하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액에 20μl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-

sulfophenyl)-2H tetrazolium (MTS)을 첨가하고 37°C에서 4시간 방치한 후, 탈수소 효소에 의한 formazan의 생성을 490nm 흡광도에서 측정하였다.

치주염관련 유전자 발현 억제 작용은 RT-PCR을 통해 실험하였는데 분리된 total RNA 2μg을 이용해서 cDNA로 합성하고 MMP-1과 MMP-3에 대한 RT-PCR를 실행하였다. 사용한 primer는 Gene bank에 의거해 디자인 하였고(Table 1) PCR 조건은, denaturation (94°C/35s), annealing (56°C/35s), extension 72°C/45s) 28 cycle, final temp. (72°C/10 min)와 같다. PCR이 끝난 후 5μl의 샘플을 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동 후 Bio-Rad Gel DocTM XR system (Bio-Rad, Hercules, CA)에서 750 bp 크기를 확인하였다.

## 4. 실험군 분류

실험군의 분류는 모두 4개의 군로서 치은섬유모 세포에 아무런 처리를 하지 않은 대조군, IL-1β [1ng/ml]을 처리한 군, IL-1β 처치 및 芍藥 100 μg/ml 또는 200 μg/ml의 추출물을 처리한 군으로 설정하였다. IL-1β는 작약 처리 하고 1시간 경과한 뒤 첨가하였고, 24시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

## 5. 치은섬유모세포에서의 유전자 발현양 분석

### 1) Total RNA 분리

배양된 치은섬유모세포에 芍藥을 처리하고 24시간 배양후, PBS로 세척하고 RNeasy Mini kit (QIAGEN, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. Microarray를 위해서 200ng/3μl가 되도록 농도를 만들어서 사용하였다.

Table 1. Primer Design

Gene	Primers	Accession No.
MMP-1	5'-GAAGGTGATGAAGCAGCCAGATGT-3' 5'-CAGTTGTGGCCAGAAAACAGAAATGAAA-3'	NM002421
MMP-3	5'-GACACCAGCATGAACCTTGTT-3' 5'-GGAACCGAGTCAGGTCTGTG-3'	NM 004530

2) Microarray Analysis

Microarray를 위한 시료 및 방법은 GeneChip® WT cDNA Synthesis Kit (Affymetrix Inc., USA)의 protocol로 진행 하였다. Total RNA 200ng을 T7-(N)6 primer를 사용하여 First-Cycle, 1st strand cDNA로 합성하였고, 합성된 cDNA를 10 $\mu$ l를 이용해서 2nd strand cDNA로 합성하였다. 2nd strand cDNA 20 $\mu$ l를 다시 cRNA로 합성한 후, Random Primer를 이용하여 1st strand cDNA로 만들어서 Fragmentation 하였다. 잘려진 cDNA를 hybridization 용액과 함께 Gene Chip ST Array septa에 넣어서 17시간 동안 반응시킨 후 염색하고 scan하였다.

6. Data 분석

Expression profiles는 GeneChip Operating Software (Affymetrix Inc., USA), Expression Console Software (Affymetrix Inc., USA)와 GenPlex v2.9를 이용하여 모든 유전자를 대상으로 분석하였다. Hybridization의 완전성은 control oligonucleotide B<sub>2</sub>, BioB, BioC, BioDn, CreX, poly A controls, pos\_vs\_neg\_auc 분석을 비교함으로써 평가하였다. 각 유전자의 발현양은 signal intensity의 평균값으로 표준화하여 average differential expression (AD)을 구한 후 비교함으로써 발현양의 차이가 있는 유전자를 구분하였다. GenPlex

v2.9는 BeadStudio에서 계산된 신호 (Signal)에 대한 표준화 작업, 유전자 선별, 클러스터 분석 및 pathway 분석에 사용하였다.

표준화 (Normalization)는 Quantile Normalization 방법을 사용했으며, 발현률이 1.5배 이상의 값을 가진 (Fold Change cutoff value 1.5) 유전자들이 유의하다고 판단하여 선택하였고, 그 중에서 background level의 값을 가진 유전자들은 제외 시켰다. 군집분석 (Clustering analysis)은 계층적 군집 (Hierarchical clustering) 연산방식을 이용하였고 유의 하게 발현이 변화되었다고 판단된 유전자와 관련된 생체내 대사 경로는 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)의 data base를 이용하여 분석하였다.

결 과

1.芍藥의 세포독성 및 치주염관련 유전자 발현 억제 실험결과

1)芍藥의 세포독성

인간치은섬유모세포에 대한芍藥의 독성을 농도 별로 24시간 동안 처리한 결과, 처리하지 않은 대조군에 비해 50~200 $\mu$ g/ml 농도까지 독성에 대한 반응은 나타나지 않았으나 500 $\mu$ g/ml의 농도에서는 많은 세포가 사멸되었음이 관찰하였다 (Fig. 1). 본 연구

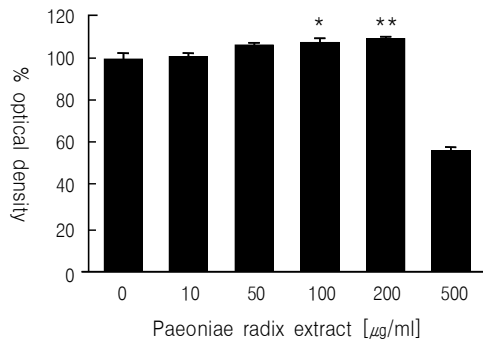


Fig. 1. Cytotoxicity effect of the *Paeoniae radix* extract in human gingival fibroblast. After human gingival fibroblast were cultured with various concentration of *P. radix* extract (10, 50, 100, 500  $\mu$ g/ml) for 24 h, the cell viability was measured in the culture supernatant by MTS assay revealed that the *P. radix* exerted no significant cytotoxicity in the human gingival fibroblast at 200  $\mu$ g/ml. Results are expressed as a percentage of the control and presented at the mean  $\pm$  S.E.M. \*p <0.05, \*\*p <0.001 compared with the control group.

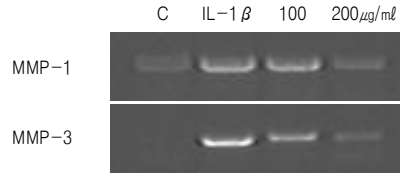


Fig. 2. Inhibitor effect of *Paeoniae radix* on the expression of MMP-1 and MMP-3 in the IL-1 $\beta$ -stimulated primary human gingival fibroblast cell culture C: control, IL-1 $\beta$  [1ng/ml] and *Paeoniae radix* 100, 200  $\mu$ g/ml

에서는 독성이 없으면서 IL-1 $\beta$ 와 같은 cytokine의 독성에 충분히 보호효과를 나타 낼 수 있고 RT-PCR에 의한 결과를 종합해서 예측되어지는 100 $\mu$ g/ml와 200 $\mu$ g/ml의 芍藥 농도를 실험에 사용하였다.

2) 芍藥의 치주염관련 유전자발현 억제

치주염과 관련된 유전자의 발현양상이 芍藥에 의해 억제되는지 알아보기 위해, 2 가지의 기질단백분해효소 (MMP)에 대한 RT-PCR을 실행하였다. 그림 2에서 보여주는 것처럼 대조군에 비해 IL-1 $\beta$  처리군에서 MMP-1에 대한 유전자의 발현증가가 관찰되었다. 그러나 芍藥을 첨가했을 시 IL-1 $\beta$  처리군에 비해 발현량이 감소되는 것이 확인되었고 芍藥의 농도 100 $\mu$ g/ml에서 보다는 200 $\mu$ g/ml에서 유전자의 발현량이 현저히 감소하였다. MMP-3에 대한 결과도 MMP-1과 유사하게 200 $\mu$ g/ml의 농도에서 발현량이 100 $\mu$ g/ml에서 보다 3배가량 감소됨이 관찰되어 芍藥이 MMP-1과 MMP-3의 유전자 발현 억제작용이 있음을 확인하였다. 상대적 양의 평가로서  $\beta$ -actin에 대한 결과도 동일한 양임을 관찰하였다.

2. Microarray

1) Scan image

(1) Hybridization 후 GeneChip의 모습

Hybridization 후의 chip의 모습은 왼쪽 하단에 실험한 chip의 이름이 선명하게 나타나며, 중앙에 control의 모습도 선명하게 나타났다. chip의 네 모서리에 oligopeptide B<sub>2</sub> control에 의한 밝은 점을 확인하였다.

(2) 대조군, IL-1 $\beta$  처리군 그리고 芍藥 100 $\mu$ g/ml 와 200 $\mu$ g/ml 처리군에 대한 scan image

실험이 끝난 gene chip을 scanner로 이미지를 읽었을 때 보이는 실제 모습으로 좌측 하단에 chip의 이름과 전형적인 중앙의 모습을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

2) 전체 실험 데이터의 상관관계 분석

Correlation matrix plot을 이용하여 전체 실험 데이터간의 상관관계를 파악한 후 Heat map을 이용하여 각 실험별 유전자 발현의 유사 정도에 대한 실험

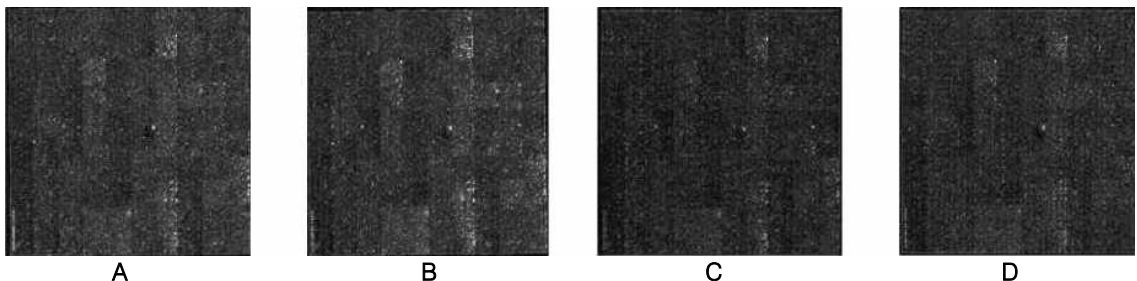


Fig. 3. Scan image of experiment gene chips.  
a: control b: IL-1 $\beta$  c: *Paeoniae radix* 100 $\mu$ g/ml and d: 200 $\mu$ g/ml treated gene chip.

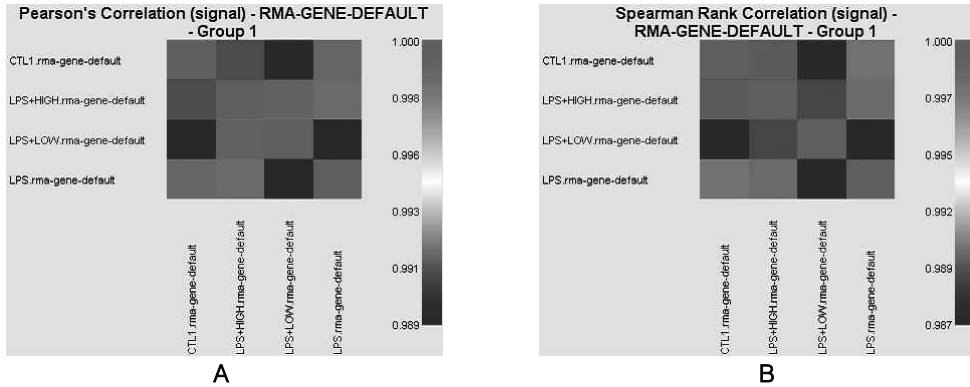


Fig. 4. Correlation analysis. a. Pearson's Correlation (signal). b. Spearman Rank Correlation (signal).

데이터의 상호 비교를 수행하였다. 그 결과 청색과 적색 범위 (상관관계 0.98-1.0)에 있음을 보여주고 있고, 이 결과를 통해 실험 데이터들이 대부분 유사한 패턴을 나타내고 있음을 확인하였다 (Fig. 4).

3) DEG selection 분석

대조군, IL-1β 처리군, 芍藥 100 μg/ml, 200 μg/ml 처리군에 대한 유전자들의 발현에 있어서 일정 수준 이상 변화 하는 유전자를 찾기 위해 comparison 분석을 시행하였다. 먼저 대조군과 IL-1β처리군 간의 발현차이를 분석하여 IL-1β처리가 유전자발현에 영향을 미치는지를 보았으며, IL-1β 처리군과 芍藥 100 μg/ml와 200 μg/ml 에서의 차이를 보이는 유의 유전자를 선별하였다. 발현차이는 Fold Change cutoff =1.5 (1.5-fold)로 하여 1.5배 이상 높게 발현되거나 (Up-regulated) 1.5배 이상 낮게 발현되는

(Down-regulated) 유전자를 선별하였고, 실험상에서 발현이 나타나지 않은 유전자 즉, detection이 “Absent”인 유전자 (background level)를 제거하였다. 각 기준에 따라 선정된 유전자들의 수를 Table 2에 나타내었다.

위의 유전자 중 대조군에 비해 IL-1β 처리군에서 유전자발현이 증가된 염증관련 유전자를 Table 3에 나타내었다.

대조군에 비해 IL-1β군에서 유전자발현이 감소된 염증관련 유전자를 Table 4에 나타내었다.

IL-1β 처리군에 비해 芍藥 100μg/ml 처리군에서 유전자발현이 증가된 염증관련 유전자를 Table 5에 나타내었다.

IL-1β 처리군에 비해 芍藥 100μg/ml 처리군에서 유전자발현이 감소된 염증관련 유전자를 Table 6에 나타내었다.

Table 2. DEG Selection Analysis

control/ experiment	Up	Up (Gene Description exist gene)	Down	Down (Gene Description exist gene)	Total (Up+Down)
control vs IL-1β treated group	782	337	981	282	1763
IL-1β-treated vs plus P. radix 100μg/ml treated group	1439	309	1225	406	2664
IL-1β-treated vs plus P. radix 200μg/ml treated group	1066	331	798	257	1864

Table 3. The Up-regulated Genes (n=43) Associated with Inflammation in the IL-1 $\beta$ -treated Group as Compared to Control Group

Gene Symbol	Gene Description	Fold Change
BMP2	bone morphogenetic protein 2	3.32
BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	1.52
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	14.62
CD70	CD70 molecule	1.76
CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	1.98
CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	2.91
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	25.59
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	23.59
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	2.65
CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	17.52
CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	51.88
IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	1.59
IL12RB1	interleukin 12 receptor, beta 1	1.55
IL1B	interleukin 1, beta	1.94
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	1.55
IL32	interleukin 32	2.51
IL33	interleukin 33	4.20
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	34.40
IL8	interleukin 8	74.24
INHBA	inhibin, beta A	1.66
IRAK2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	2.62
IRAK3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	1.71
LEFTY2	left-right determination factor 2	1.54
LIF	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	4.38
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	1.52
LTA	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	1.80
MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	1.52
MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	2.05
MMP3	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	21.56
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	1.85
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	3.94
PTGES	prostaglandin E synthase	2.35
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2.68
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	1.92
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3.30
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1.78
TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	2.07
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	1.82
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	2.49
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	2.20
TRAA	T cell receptor alpha locus	1.51
TRAF3IP2	TRAF3 interacting protein 2	1.50
TSLP	thymic stromal lymphopoietin	1.75



Table 4. The Down-regulated Genes (n=7) Associated with Inflammation in the IL-1 $\beta$ -treated Group as Compared to Control Group

Gene Symbol	Gene Description	Fold Change
BMP4	bone morphogenetic protein 4	0.51
CRLF2	cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2), transcript variant 1, mRNA	0.61
CTGF	connective tissue growth factor	0.50
FGF5	fibroblast growth factor 5	0.54
GREM2	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	0.62
MSTN	myostatin	0.50
SP110	SP110 nuclear body protein	0.60

Table 5. The Up-regulated Genes (n=5) Associated with Inflammation in the P. Radix 100  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  plus IL-1 $\beta$ -treated Group as Compared to IL-1 $\beta$ -treated Group Alone

Gene Symbol	Gene Description	Fold change
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1.56
ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	1.52
GDF15	growth differentiation factor 15	1.56
LIF	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	1.51
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	1.53

Table 6. The Down-regulated Genes (n=5) Associated with Inflammation in the P. Radix 100  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  plus IL-1 $\beta$ -treated Group as Compared to IL-1 $\beta$ -treated Group Alone

Gene Symbol	Gene Description	Fold change
CCL22	chemokine (C-C motif) ligand 22	0.62
CXCL14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	0.62
IL12RB1	interleukin 12 receptor, beta 1	0.66
IL24	interleukin 24	0.60
IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	0.62

Table 7. The Up-regulated Genes (n=14) Associated with Inflammation in the P. Radix 200  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  plus IL-1 $\beta$ -treated Group as Compared to IL-1 $\beta$ -treated Group Alone

Gene Symbol	Gene Description	Fold change
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	2.05
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	1.70
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1.87
CXCR7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	1.71
GDF15	growth differentiation factor 15	2.50
GRN	granulin	1.50
HAX1	HCLS1 associated protein X-1	1.56
IFNA10	interferon, alpha 10	1.55
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	1.73
MIF	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	1.53
PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1	1.60
PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1	1.62
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1.89
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	3.04

Table 8. The Down-regulated Genes (n=4) Associated with Inflammation in the P. Radix 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  plus IL-1 $\beta$ -treated Group as Compared to IL-1 $\beta$ -treated Group Alone

Gene Symbol	Gene Description	Fold change
CD70	CD70 molecule	0.64
CMTM5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	0.66
SCG2	secretogranin II (chromogranin C)	0.65
TNFRSF13B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	0.61

IL-1 $\beta$  처리군에 비해 芍藥 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 유전자발현이 증가된 염증관련 유전자를 Table 7에 나타내었다.

IL-1 $\beta$  처리군에 비해 芍藥 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 유전자발현이 감소된 염증관련 유전자를 Table 8에 나타내었다.

4) Clustering 분석

대조군과 IL-1 $\beta$  처리군, 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  와, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군의 유전자 발현양의 변화 중 IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 증가되고 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 IL-1 $\beta$  처리군보다 발현양이 감소되는 패턴을 가지는 89개의 유전자를 찾아 clustering 하였고, 또한 IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 감소되고 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 IL-1 $\beta$  처리군보다 발현양이 증가되는 패턴을 가지는 193개의

유전자를 찾아 clustering하여 유의미한 발현을 나타내는 유전자를 탐색하였다.

(1) IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 증가되고 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 IL-1 $\beta$  처리군 보다 발현양이 감소되는 패턴

각 그룹에 대한 유전자들의 발현 패턴을 시각화한 그림 5에서 명암 (원색은 적색과 녹색)에 의해 유전자 발현이 표현 되었는데, 대조군 (검정)에 비해 IL-1 $\beta$  처리군은 회색으로서 발현이 증가됨을 나타내었고, 芍藥 처리 시 IL-1 $\beta$ 에 의해 증가된 유전자들의 발현이 감소되는 패턴을 보였다. 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  보다는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서보다 대조군에 가까운 검정색이 관찰되어 芍藥의 농도가 높을 때 IL-1 $\beta$ 에 의해 증가된 유전자들이 더 많이 감소되는 것으로 관찰되었다.

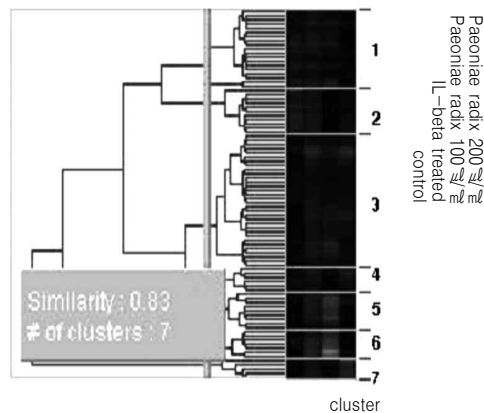


Fig. 5. The cluster analysis of the differentially expressed genes that increased gene expression when treated with IL-1 $\beta$  on gene subsets that were decreased on P. radix-treated group plus IL-1 $\beta$  compared to IL-1 $\beta$ -treated group alone.

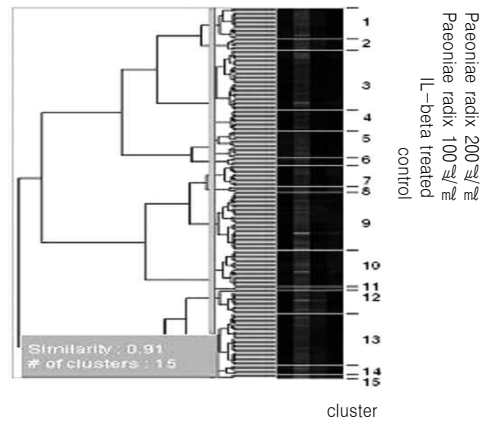


Fig. 6. The cluster analysis of the differentially expressed genes that decreased gene expression when treated with IL-1 $\beta$  on gene that were increased on P. radix-treated plus IL-1 $\beta$  group as compared to IL-1 $\beta$ -treated group alone.

(2) IL-1 $\beta$ 에서 발현양이 감소되고芍藥 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 200 $\mu\text{g/ml}$  처리군에서 IL-1 $\beta$  보다 발현양이 증가되는 패턴

그림 6에서의 유전자 발현 패턴은 앞에서 서술한 내용과 상반되게 대조군 (검정)에 비해 IL-1 $\beta$  처리

군 (밝은톤 회색)에서는 발현양이 감소됨이 관찰되었고,芍藥 처리 시 IL-1 $\beta$ 에 의해 감소된 유전자들의 발현이 증가되는 패턴을 보였다.芍藥 100 $\mu\text{g/ml}$  보다는 200 $\mu\text{g/ml}$  처리군에서보다 대조군에 가까운 검정색이 관찰되어芍藥의 농도가 높을 때 IL-1 $\beta$ 에

Table 9. List of Down-regulated Genes in the P. Radix plus IL-1-treated Group (n=89) When Compared with Up-regulated Genes in the IL-1-treated Group. The Table Lists Genes That were Already Existing in the UniGene .

UniGene ID	Gene description (Gene Symbol)	Cluster	control	IL1 $\beta$ -treated	P. radix 100 $\mu\text{g/ml}$ treated	P. radix 200 $\mu\text{g/ml}$ treated
Hs.126248	collagen, type IX, alpha 3 (COL9A3)	3	7.28	7.91	7.09	7.21
Hs.143436	plasminogen (PLG)	1	4.19	4.94	4.33	4.34
Hs.17686	KIAA1543 (KIAA1543)	3	5.58	6.25	5.50	5.45
Hs.284255	alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme) (ALPP)	5	5.33	5.93	4.16	4.74
Hs.287518	-	3	5.18	5.84	4.85	5.15
Hs.33191	unc-5 homolog A (C. elegans) (UNC5A)	3	5.59	6.19	5.43	5.56
Hs.439894	-	2	4.03	5.16	4.45	4.25
Hs.703785	-	2	4.03	5.16	4.45	4.25
Hs.531041	FLJ42875 protein (FLJ42875)	3	6.65	7.33	6.46	6.49
Hs.548021	-	5	5.17	5.77	4.29	4.92
Hs.632233	-	5	5.17	5.77	4.29	4.92
Hs.635230	similar to Golgin subfamily A member 6 (Golgin linked to PML) (Golgin-like protein) (LOC441728)	5	5.74	6.33	5.28	5.68
Hs.654610	-	1	5.37	6.19	5.53	5.58

Table 10. The Significant Genes Appeared a Pattern of Down Regulation in the IL-1 $\beta$ -treated and Up Regulation more than the IL-1 $\beta$ -treated in the P. Radix 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Treated Group.

UniGene ID	Gene description (Gene Symbol)	Cluster	control	IL-1 $\beta$ -treated	P. radix 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated	P. radix 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ treated
Hs.352661	-	4	5.38	4.73	5.45	5.33
Hs.372360	-	3	6.63	6.00	6.64	6.67
Hs.434253	chromosome 9 open reading frame 3 (C9orf3)	9	6.27	5.44	6.81	6.90
Hs.441975	-	9	6.80	6.12	7.12	7.09
Hs.442657	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (PDK1)	3	7.31	6.59	7.27	7.22
Hs.470633	-	7	7.77	7.18	7.82	8.15
Hs.479403	-	4	6.97	6.29	7.09	7.00
Hs.50282	-	3	6.23	5.51	6.23	6.37
Hs.631504	-	5	5.10	4.23	4.91	4.87
Hs.632348	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8 (SLC7A8)	1	8.03	7.21	8.04	7.80
Hs.658578	-	7	5.91	4.82	5.88	6.54
Hs.686109	-	9	6.53	5.90	6.70	6.94

의해 감소된 유전자들이 더 많이 증가되는 것으로 나타났다.

5) 유전자 발현양 패턴에 따른 clustering 후 유의유전자 분석  
위의 clustering 방법을 이용하여 분석한 유전자들에서 약물처리 농도에 따라 대조군과 IL-1 $\beta$  처리군,

芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군의 발현양의 변화를 같은 패턴으로 나타내는 유전자를 검색한 후 UniGene ID가 존재하는 유전자를 정리하였다.

IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 증가되고 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 IL-1 $\beta$  처리군보다 발현양이 감소되는 패턴으로 검색된 89개의 유전자중 UniGene ID가 존재하는 유전자들을 찾아 정리하였

Table 11. The Pathway Analysis of the Significant Genes Appeared in the DEG Analysis of the IL-1 $\beta$ -treated and the P. Radix 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  plus IL-1 $\beta$ -treated Gene (\* p < 0.05 )

KEGG Pathway	P-value	UniGene ID(Gene Symbol) (gene expression pattern up/down)	Gene Counts
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.0000668*	Hs.303649 (CCL2 up), Hs.483444 (CXCL14 down), Hs.534347 (CCL22 down), Hs.567294 (IL12RBI down)	4
Toll-like receptor signaling pathway	0.044*	Hs.591983 (TRAF6 up)	1
Jak-STAT signaling pathway	0.072	Hs.567294 (IL12RBI down)	1
Jak-STAT signaling pathway	0.073	Hs.2250 (LIF up)	1
Tryptophan metabolism	0.095	Hs.154654 (CYP1B1 up)	1
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.119	Hs.2250 (LIF up)	1
MAPK signaling pathway	0.130	Hs.591983 (TRAF6 up)	1
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0.136	Hs.154654 (CYP1B1 up)	1
Leukocyte transendothelial migration	0.173	Hs.483444 (CXCL14 down)	1

Table 12. The Pathway Analysis of the Significant Genes Appeared in the DEG Analysis of the IL-1β- and the P. Radix 200 μg/ml plus IL-1β-treated Gene (\* p < 0.05 )

KEGG Pathway	P-value	UniGene ID (Gene symbol) (gene expression pattern up/down)	Gene Counts
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0.003*	Hs.154654 (CYP1B1 up), Hs.203634 (GSTO2 down)	2
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.004*	Hs.158341 (TNFRSF13B down), Hs.282275 (IFNA10 up), Hs.303649 (CCL2 up)	3
Phenylalanine metabolism	0.013*	Hs.407995 (MIF up)	1
Tyrosine metabolism	0.027*	Hs.407995 (MIF up)	1
Antigen processing and presentation	0.036*	Hs.512572 (KIR2DS2 down)	1
Regulation of autophagy	0.039*	Hs.282275 (IFNA10 up)	1
Porphyrin and chlorophyll metabolism	0.041*	Hs.517581 (HMOX1 up)	1
Nicotinate and nicotinamide metabolism	0.058	Hs.489615 (PBEF1 up)	1
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.058	Hs.512572 (KIR2DS2 down)	1
Glutathione metabolism	0.067	Hs.203634 (GSTO2 down)	1
Antigen processing and presentation	0.106	Hs.282275 (IFNA10 up)	1
Tryptophan metabolism	0.113	Hs.154654 (CYP1B1 up)	1
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.119	Hs.501497 (CD70 down)	1
Toll-like receptor signaling pathway	0.128	Hs.282275 (IFNA10 up)	1
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0.166	Hs.282275 (IFNA10 up)	1
Jak-STAT signaling pathway	0.204	Hs.282275 (IFNA10 up)	1

다 (Table 9).

IL-1β 처리군에서 발현양이 감소되고 芍藥 100μg/ml 과 200μg/ml 처리군에서 IL-1β처리군보다 발현 양이 증가되는 패턴으로 검색된 193개의 유전자중 UniGene ID가 존재하는 유전자들을 찾아 정리하였다 (Table 10).

6) 유전자발현의 Pathway 분석

유의유전자들 각각의 pathway를 분석하기 위해 UniGene ID를 가지고 gene ontology를 이용하여 pathway를 검색하였다.

(1) IL-1β 처리군과 芍藥 100μg/ml 처리군의 DEG분석에서 나타난 유의유전자의 pathway 분석 (Table 11)

Table 13. The Pathway Analysis Appeared a Pattern of Up-regulated both in 100 μg/ml and 200 μg/ml P. Radix plus IL-1β Treatment Group When Compared with IL-1β-treated Group Alone (\* p < 0.05 )

Gene Description (Gene Symbol)	KEGG Pathway	P-value
chromosome 9 open reading frame 3 (C9orf3)		
XIAP associated factor-1 (XAF1)		
pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (PDK1)	T cell receptor signaling pathway	0.02*
	Fc epsilon RI signaling pathway	0.01*
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8 (SLC7A8)		

Table 14. The Pathway Analysis Appeared a Pattern of Down-regulated both in 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  P. Radix plus IL-1 $\beta$  Treatment Group, Compared with IL-1 $\beta$ -treated Group (\* p < 0.05 )

Gene Description (Gene Symbol)	KEGG Pathway	P-value
plasminogen (PLG)	Neuroactive ligand-receptor interaction	0.19
	Complement and coagulation cascades	0.04*
alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme) (ALPP)	gamma-Hexachlorocyclohexane degradation	0.01*
	Folate biosynthesis	0.02*
unc-5 homolog A (C. elegans) (UNC5A)	Axon guidance	0.09

- (2) IL-1 $\beta$  처리군과 芍藥 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군의 DEG 분석에서 나타난 유의유전자의 pathway 분석 (Table 12).
- (3) IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 감소되고, 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 IL-1 $\beta$  발현양이 증가되는 패턴에서의 유의유전자 pathway 분석 (Table 13)
- (4) IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 증가되고, 芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서 발현양이 감소되는 패턴의 유의유전자 pathway 분석 (Table 14)

### 고찰

치주염의 원인요소가 세균에 의한 구강 내 미생물과 관계가 있다는 것을 네덜란드의 Anthonie van Leeuwenhoek (1632-1723)에 의해 처음으로 보고되었다. Jordan과 Keyes는 동물실험을 통해 치주염이 세균의 감염으로 기인한다는 것을 증명하였고<sup>29)</sup>, Løe와 Theilade는 임상시험에서 세균과 치주질환과의 관계를 증명하였다<sup>30)</sup>. 치주염과 관련한 혐기성 세균들에 대한 연구는 1970에 들어서 Socransky에 의해 시작되었고<sup>31)</sup>, 1976년 Loesche에 의해 혐기성 세균 분리 검정이 시작되면서 본격화 되었다<sup>32)</sup>. 그러나 치주염 환자에게 항생제인 tetracycline, metronidazole 및 clindamycin의 치료 후에 임상적으로 향상되었다는 보고가 있으나, 구강 내 세균에서 기존의 항생제에 대한 내성균들이 확인되면서 항생제의 적용에 대한 문제점이 나타났다.

치주염에 관한 약물 연구는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 세균에 작용하는 항생제와 항균제 그리고 염증진행과정을 조절하는 항염제이다. 항염제에 대한 연구는 치주염의 진행 및 조직파괴와 관련된 중요한 요소인 cytokine, prostaglandin, collagenase 등과 관련된 것으로, 이는 염증과정이 세균의 감염에 대한 숙주의 반응과정에서 각종의 염증성 cytokine 이 분비되고 다시 염증성 cytokine에 의해서 prostaglandin이나 collagenase 등이 활성화되어 조직을 파괴하는 일련의 과정을 억제하거나 활성을 중지하고자 함이다. 비스테로이드성 항염증제 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)는 생체내에 고르게 분포하는 COX 활성을 차단함으로써 염증성 prostaglandin의 생성을 억제하여 항염 및 진통효과를 가지고 있으나, 위 점막 손상, 신장기능이상 등의 부작용이 있다. Flurbiprofen 등의 비스테로이드성 항염제 계통의 약물들은 prostaglandin E2 (PGE2) 생산억제에 효과가 있지만 저 농도로 장기간 복용할 경우 골재생의 효과를 보인다는 보고가 있다<sup>28)</sup>. 그러나 최근에는 질병 진행과정에 있어서 숙주관련 인자에 대해 많이 알려지게 되면서 염증성 cytokine과 matrix metalloproteases (MMPs)에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>33)</sup>.

치은섬유모세포와 관련된 연구로는 윤 등의 DNA microarray법을 이용한 치주염의 유전자발현연구<sup>34)</sup>, 한의학적 연구로는 치주염에 대한 항염작용을 연구한 김 등의 비파열과 인진의 치주염세균에 대한 항균 및 항염효과 등에 관한 연구가 있다<sup>35)</sup>.

본 연구는 기존연구를 기반으로 유전자발현 분석

중에서도 최근에 개발된 새로운 방법인 whole transcript sense target (WT ST) labeling assay를 통해 IL-1 $\beta$ 로 활성화시킨 사람의 치은섬유모세포에서의 유전자 발현이芍藥 추출물에 의해 변화가 되는 염증관련 유전자에 대해 고찰하였다.

IL-1 $\beta$  처리군에서는 대조군에 비해 782개 유전자의 발현양이 증가했고, 981개의 발현양이 감소하였다. 발현이 증가된 782개의 유전자 중에서 염증과 관련된 유전자는 모두 43개 (Table 2)로서 BMP (bone morphogenetic protein) Chemokine, TNF (tumor necrosis factor) 그룹에 속하며, 감소된 981개의 유전자 중에서는 모두 7개로 염증관련과는 연관성이 적은 그룹에 속하였다 (Table 3). 이러한 결과는 IL-1 $\beta$  처리에 의해서는 대부분이 염증관련 유전자가 발현됨을 시사하였다.

IL-1 $\beta$  처리군과芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 1439개의 유전자가 발현양이 증가했고, 1225개의 유전자가 발현양이 감소하였다. 증가된 유전자중 5개의 유전자가 (Table 4) 그리고 감소된 유전자중 5개의 유전자가 (Table 5) 염증과 관련된 것으로 IL-1 $\beta$  처리 시 대조군에 비해 발현이 증가된 유전자 43개에 대해 대부분이 발현이 되지 않았고 GDF15 (growth differentiation factor 15) LIF (leukemia inhibitory factor)와 같은 억제 및 분화와 관련된 유전자가 발현이 되었다. GDF15는 transforming growth factor beta superfamily로서 상처가난 조직이나 질병에 염증 및 apoptotic pathway에 관련하여 발현이 되며<sup>36)</sup> 유방암 세포의 증식을 억제한다<sup>37)</sup>. IL-1 $\beta$  처리군과芍藥 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 1066개의 유전자가 발현양이 증가했고, 798개의 유전자가 발현양이 감소하였다. 증가된 염증관련 유전자는 14개 (Table 6)와 감소된 유전자는 4개 (Table 7)인데芍藥 처리 후 두 가지 농도 모두에서 증가된 유전자들의 fold change가 1.5보다 높은 값을 나타내어 감소된 유전자들의 fold change (1<)보다 더 유의한 유전자로 판단되었다.

Pathway 분석에서는芍藥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군 모두에서 cytokine-cytokine receptor interaction,

Toll-like receptor signaling, Jak-STAT signaling 그리고 Tyrosine metabolism과 관련된 경로가 공통적으로 발현이 되었고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군보다 metabolism에 관련된 경로에 더 많이 작용한 것으로 나타났다. 이는 MMP-1과 -3의 RT-PCR에 대한 결과에서도芍藥 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리 시 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  보다 유전자발현량이 현저히 감소되는 양상과 일치 한다고 사료된다 (Fig. 2). IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 감소하고芍藥 처리 시 증가되는 pathway와, 발현양이 증가하고芍藥 처리 시 감소될 때 공통적으로 나타나는 경로는 없었고 염증억제 기전과 관련된 경로도 나타나지 않았다. 이는芍藥의 기능이 세포질에서의 기능뿐만 아니라 핵내에서의 기능에도 많은 영향을 미친다는 의미로서 사료되는데 inflammation과 관련된 transcription 관련유전자들을 분석해본 결과, 두 가지 농도芍藥 처리군에서 IL-1 $\beta$  처리군에 비해 모두 45개의 transcription 관련유전자의 발현이 감소하였고 30개의 유전자들의 발현양이 증가함을 보였다 (결과 미제출). 따라서芍藥은 염증과 관련된 유전자들만이 아니라 transcription factor에 관여하는 유전자들도 활성화시키는 것으로서 향후 실험목적에 검토되어야 하는 부분으로 사료된다.

치주염에 있어서의芍藥의 효능은 항염증기전과 관련된 유전자의 발현에 영향을 미치는 것 뿐만 아니라 transcription 과 관련된 유전자에도 영향을 미치는 것으로 이번 연구결과를 토대로 개개의 유전자에 대한 연구를 한다면芍藥을 이용한 염증치료의 새로운 기전 및 치주염의 치료방법을 개발할 수 있는 가능성을 높일 것으로 사료되어진다.

## 결론

IL-1 $\beta$ 로 활성화 시킨 인간치은섬유모세포에서의 유전자발현이芍藥약물에 의해 변화가 되는 염증관련 유전자 패턴에 대해 WT ST labeling assay를 이용하여, Expression console과 gene ontology로 분석한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DEG (cutoff=1.5fold) 분석 결과, IL-1 $\beta$  처리군에서는 대조군에 비해 782개 유전자의 발현양이 증가하였는데 염증과 관련된 유전자는 모두 43개로서 대체적으로 BMP관련 (bone morphogenetic protein: BMP2, BMP7) Chemokine 관련 (CCL2, CXCL1, CXCL2, 3, 5, 6), Interleukin 관련 (IL-6, 8, 32, 33, IRAK2, -3), TNF관련 (tumor necrosis factor: TGFB2, TNFAIP3, 6, 8, TNFRSF9) 등의 그룹에 속하였고, 감소된 981개의 유전자 중에서는 염증관련 유전자는 모두 7개 였다.

芍藥 100 $\mu$ g/ml 처리군에서는 IL-1 $\beta$  처리군보다 1439개의 유전자 발현양이 증가하였고 1225개의 유전자가 감소하였는데, 감소된 유전자중 transforming growth factor beta superfamily (GDF15) 와 LIF (leukemia inhibitory factor) 같이 억제 및 분화와 관련된 유전자가 발현이 되었다.

2. Pathway 분석에서는 芍藥 100 $\mu$ g/ml와 200 $\mu$ g/ml 처리군 모두에서 cytokine-cytokine receptor interaction, Toll-like receptor signaling, Jak-STAT signaling 그리고 Tyrosine metabolism과 관련된 경로가 공통적으로 발현이 되었고 200 $\mu$ g/ml 처리군에서는 100 $\mu$ g/ml 처리군보다 metabolism에 관련된 경로에 더 많이 작용한 것으로 나타났다. IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 감소하고,芍藥 처리 시 증가되는 유의 유전자 pathway와 IL-1 $\beta$  처리군에서 발현양이 증가하고,芍藥 처리 시 감소될 때 공통적으로 나타나는 경로는 없었고 염증억제 기전과 관련된 경로도 나타나지 않았다. 이는 芍藥의 기능이 세포질에서의 기능뿐만 아니라 핵내에서의 기능에도 많은 영향을 미친다는 의미로서 芍藥이 염증과 관련된 유전자들만이 아니라 transcription factor에 관여하는 유전자들도 활성화시키는 것으로서 향후 실험목적에 검토되어야 하는 부분으로 사료된다.

감사의 글

“이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2009-0079627).”

참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울: 도서출판 영림사. 1991:195-6.
2. 허준. 국역증보 동의보감. 서울: 남산당. 1991; 298:307-17.
3. Kamiya K, Yoshioka K, Saiki Y, Ikuta A, Satake T. Triterpenoids and flavonoids from *Paenonia lactiflora*. *Phytochemistry*. 1997;44:141-4.
4. Zheng YQ, Wei WI. Total glucosides of paeony suppresses adjuvant arthritis in rats and intervenes cytokine-signaling between different types of synoviocytes. *Int Immunopharmacol*. 2005;5: 1560-73.
5. Zhu L, Wei W, Zheng YQ, Jia XY. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on joint damage in rat collagen-induced arthritis. *Inflamm Res*. 2005;54:211-20.
6. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당. 2004:471-2.
7. 전국치주과학교수협의회. 치주과학. 서울: 군자출판사. 2004:116.
8. 김영권, 한만덕. 구강미생물학. 서울: 고문사. 2003;256:321-66.
9. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.
10. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75(1):106-15.
11. Choi DH, Moon IS, Choi BK, Paik JW, Kim YS,



- Choi SH, et al. Effect of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. *J Periodont Res.* 2004;39(1):20-6.
12. Kim CK, Chai JK, Cho KS, Moon IS, Choi SH. Clinical study of standard extract of the unsaponifiable fraction of zea mays L. on therapeutic effect in periodontitis. *J Korean Acad Periodontol.* 1991;21(2):225-34.
  13. Helgeland K, Heyden G, Rolla G. Effect of chlorhexidine on animal cells *in vitro*. *Scan J Dent Res.* 1971;79:209-15.
  14. Jang BS, Chung CP, Son SH, Bae KH. The effects of honokiol and magnolol on the antimicrobial, bacterial collagenase activity, cytotoxicity and cytokine production. *J Korean Acad Periodontol.* 1993;23:145-58.
  15. Kim TI, Choi EJ, Chung CP, Han SB, Ku Y. Antimicrobial effect of Zea Mays L. and Magnoliae cortex extract mixtures on periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblast cellular activity. *J Korean Acad Periodontol.* 2002;32:249-55.
  16. Chung CP, Ku Y, Bae KH. Biological Effect of Magnolia and Ginkgo Biloba Extract to the Antimicrobial, Antiinflammatory and Cellular Activity. *J Korean Acad Periodontol.* 1995;25:478-86.
  17. Jung JG, Chung CH, Yim SB, Kim JK, So EH. The effects of Pulsatilla Koreana for Anti-Inflammatory and Cellular Activity of Periodontal Tissue. *J Korean Acad Periodontol.* 2001;31:149-64.
  18. Hong JY, Kim SN, Ha WH, Chang SY, Jang IK, Park JE, et al. Suppressive effect of Curcuma xanthorrhiza oil on plaque and gingivitis. *J Korean Acad Periodontol.* 2005;35:1053-71.
  19. Cho MJ, Hong SJ, Choi CH, Jeong SS. Effects of dentifrice containing extract of Galla Rhois or Psoralea corylifolia on inhibition of plaque formation. *J Korean Acad Dental Health.* 2005;29:141-52.
  20. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today.* 2000;6:149-156.
  21. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491-4.
  22. Nagase H, Visse R, Murphy G. ructure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69:562-73.
  23. Beklen A, Tüter G, Sorsa T, Hanemaaijer R, Virtanen I, Tervahartiala T, et al. Gingival tissue and crevicular fluid co-operation in adult periodontitis. *J Dent Res.* 2006;85(1):59-63.
  24. Lin SJ, Chen YL, Kuo Mark YB, Li CL, Lu HK. Measurement of gp130 cytokines-Oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine.* 2005;30:160-7.
  25. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2,8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(3):437-9.
  26. Jeon CY, Park JW, Lee JM, Suh JY. A Comparative Study of Gene Expression Patterns of Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts using the cDNA Microarray. *J Korean Acad Periodontol.* 2004;34(1):205-21.
  27. Chang YC, Tsai CH, Yang SH, Liu CM, Chou MY. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodont Res.* 2003;38:496-501.
  28. Chang YC, Lai CC, Lin LF, Ni WF, Tsai CH. The upregulation of heme oxygenase-1 expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodont Res.* 2005;40:252-7.
  29. Jordan HV, Keyes PH. *In vitro* methods for the study of plaque formation and carious lesions.

- Arch Oral Biol. 1966;11:793-802.
30. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Löe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodontal Res. 1966;1:1-13.
  31. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res. 1970;49:203-22.
  32. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev. 1976;9:65-107.
  33. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral disease. Oral Disease. 2004;10:311-18.
  34. Yoon SJ, Kim BO, Yoon JH, Kang DW, Jang HS. Profiling of genes in healthy hGF, aging hGF, healthy hPDLF and inflammatory hPDLF by DNA microarray. J Korean Acad Periodontol. 2006;36(3):767-82.
  35. Jeong MY, Kim YH, Lee NK, Lee JY, Herr Y, Lee JH, et al. Antimicrobial Effect on the Periodontal Pathogens and Anti-inflammatory Effect of Eriobotryae Folium. J Korean Oriental Med. 2008;29(2):182-92.
  36. Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, McGrath SA, Esquela AF, Koniaris LG. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. Shock. 2005;23: 543-8.
  37. Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, et al. Placental transforming growth factor- $\beta$  is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. J Biol Chem. 2000;275(26):20127-35.