

皂角刺가 estradiol valerate로 유발된 白鼠의 다낭성 난소에 미치는 영향

동신대학교 한의과대학 부인과학교실

구희준, 조성희

ABSTRACT

Effects of *Gleditsiae Spina*(GS) on the Polycystic Ovary Induced by Estradiol Valerate in Rats

Hee-Jun Gu, Sung-Hee Cho

Dept. of Gynecology, college of Oriental Medicine, Dongshin University

Purpose: In the theory of traditional medicine, *Glenditsia spina*(GS) can resolve carbuncle, relive swelling, dispel wind and destroy parasites. This study was designed to investigate the effects of GS on gene expression of ovarian tissue in polycystic ovary syndrome(PCOS) rats.

Methods: In this experiment, female rats injected with a single dose of 2 mg estradiol valerate(EV) and GS was given for 5 weeks. The genetic profile for the effects on ovarian tissue in PCOS rats was measured using microarray technique, and the functional analysis on these genes was conducted.

Results: 985 genes were increased in control and restored to normal level in GS group. (B), 733 genes were decreased in control group and restored to normal level in GS group. (F). Metabolic pathways related in B group genes were Graft-versus-host disease, Allograft rejection, Autoimmune thyroid disease, Cytokine-cytokine receptor interaction, Small cell lung cancer, Type I diabetes mellitus. Metabolic pathways related in F group genes were Antigen processing and present, Adipocytokine signalling pathway, Focal adhesion, ECM-receptor interaction, Pancreatic cancer, Notch signalling pathway, Tight junction. The network of total protein interactions was measured using cytoscape program, and some key molecules, such as c-Fos, c-Myc, ABL1 related in B group, MAPK8, RASA1, CALR related in F group that can be used for elucidation of therapeutical mechanism of medicine in future were identified.

Conclusion: These results suggest possibility of GS as anti-cancer and anti-hyperplasia drug in PCOS. In addition, the present author also suggests that related mechanisms are involved in suppression of proto-oncogene such as c-Fos, c-Myc and ABL1, and in regulation of cell cycle such as RASA1.

Key Words: Polycystic ovary syndrome(PCOS), *Glenditsia spina*, Anti-hyperplasia drug

I. 서론

다낭성 난소 증후군(PCOS: polycystic ovary syndrome)은 여러 증상과 징후들이 복합적으로 나타나는 가임기 여성에서 가장 흔한 내분비 질환으로, 안드로겐 과다, 배란장애 및 불임, 무월경이나 희소월경, 비만, 다모증, 다낭성 소견의 난소 양상 등을 특징적으로 보인다. 현재까지 병태 생리가 완전히 밝혀지지 않았으며, 고인슐린혈증과 고안드로겐혈증에 의한 호르몬 불균형으로 인해 난소의 기능적 이상이 초래되는 것으로 알려지고 있다^{1,2)}.

한의학에서는 經閉, 月經不調, 無子, 肥胖, 不妊, 多毛 등의 범주로 인식하였으며, 虛證인 腎虛, 氣血兩虛, 脾腎陽虛, 陰虛內熱 등과 實證인 肝鬱化火, 痰濕阻滯, 氣滯血瘀, 그리고 虛實挾雜인 腎虛痰實, 腎虧血瘀등으로 변증해 치료하고 있으며, 氣血兩虛型에는 歸脾湯加減方을, 脾腎陽虛型에는 附桂八物丸加減方을, 肝鬱化火型은 龍膽瀉肝湯加減方을, 痰實型에는 皂角刺, 穿山甲, 香附子, 丹蔘 등을 활용하였다³⁻⁸⁾.

皂角刺는 콩과(Leguminosae)에 속한 落葉喬木인 조각자나무(*Gleditsia sinensis* Lam), 주엽나무(*G. japonica* var. *korainensis* Naki)의 가시를 건조한 것으로 辛溫, 無毒하며 消腫, 托毒, 排膿, 祛風殺蟲하여 癰疽, 瘡腫, 神經痛, 關節炎 및 癥瘕結塊, 胎衣不下 등의 질환에 사용되고 있으며^{9,10)}, 실험적 연구로는 만성 전립성염 세포에 대한 효과¹¹⁾, 항산화 작용¹²⁾, 소염 작용¹³⁾, 항암효과¹⁴⁾ 등이 보고되었다.

PCOS에 대한 실험연구로는 蒼附導痰

湯¹⁵⁾, 腎氣丸合蒼附導痰湯¹⁶⁾, 定經湯¹⁷⁾, 歸脾湯¹⁸⁾, 蒼附六君湯¹⁹⁾, 紅蔘추출물²⁰⁾ 등을 이용한 연구가 있다.

이에 본 저자는 PCOS의 치료에 대하여 皂角刺(*Gleditsiae Spina*, GS)의 활용도와 기전을 알아보기 위하여 흰쥐에 PCOS를 유발한 다음, 皂角刺를 투여하고 난소 조직을 적출하여 microarray 기법으로 유전자 발현 양상을 분석한 결과 다음과 같은 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 동 물

실험동물은 160~180g의 S/D계 암컷 백서를 샘타코(인천, 한국)로부터 구입하여 사용하였다. 1주일 이상, 고행사료(삼양 배합사료 실험동물용, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 충분히 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험실 환경은 온도 22±2℃를 유지하면서 12시간 단위로 낮과 밤이 계속되는 상황을 실험 종료 시까지 유지하였다.

2) 약재의 준비

본 실험에서 皂角刺(*Gleditsiae Spina*, GS)는 콩과에 속한 조각자나무(*Gleditsia sinensis* Lam), 또는 주엽나무(*G. japonica* var. *korainensis* Nakai)의 가시를 건조한 것으로 동신대학교 광주 한방병원에서 구입한 것 주엽나무 가시를 건조한 조각자를 정선하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

PCOS 유발을 위하여 β-Estradiol 17-valerate(EV, Sigma, USA)를 사용하였

고, 시료 조제를 위하여 전기약탕기(대웅, 한국), 감압농축기(EYELA, Japan), 동결건조기(Labconco, Missouri, USA), 강제순환건조기(제이오텍, 한국)를 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료의 조제

세척되고 세절된 상태로 구입된 皂角刺 200g을 증류수 1,500ml에 넣어 상온에서 24시간 동안 방치한 후, 전기약탕기(대웅, 한국)를 이용하여 30분 동안 전탕하여 물 추출을 시행하였다. 얻어진 전탕액을 5,000G에서 10분간 원심분리하여 찌꺼기는 버리고 상청액을 얻은 다음 감압 농축하고, 동결건조기(Labconco, Missouri, USA)를 이용하여 동결건조 분말을 조제하였다. 얻어진 추출물은 30.2g으로 수율은 15.1%였다.

2) PCOS의 유발

β -Estradiol 17-valerate(EV, Sigma, USA)의 1회 근육 주사법²⁰⁾을 이용하여 PCOS를 유발하였다. 간략히 정리하면, Sesame oil(Sigma, USA)에 EV를 녹인 후, 0.45 mm Syringe Filter(Whatman, Springfield, UK)로 걸러줌으로써 멸균을 대신하였다. 이렇게 하여 얻어진 EV용액을 20mg/kg의 분량으로 1회 근육 주사하였고, 정상군은 동일한 양의 Sesame oil을 근육 주사하였다. 근육주사 후 2일간 관찰한 다음, 5주간 약물을 투여하였다.

3) 실험군의 선정

정상군(Normal group)은 EV를 녹이지 않은 Sesame oil 200 μ l를 대퇴부에 근육 주사하였다. 대조군(Control group)과 실험군(GS group)은 EV를 Sesame oil에 20mg/kg의 분량으로 녹여 마리당 200 μ l

씩 대퇴부에 근육 주사하였다.

정상군(Normal group, n=8)은 다낭성 난소를 유발하지 않고, 5주간 정상식을 투여하였고, 대조군(Control group, n=8)은 다낭성 난소를 유발시킨 후, 5주간 정상 식이를 투여하였다. 실험군(GS group, n=8)은 다낭성 난소를 유발시킨 후, 皂角刺 추출물을 5g/kg으로 고형사료에 섞어 투여하였다.

4) RNA 분리

Microarray 분석을 위한 RNA 분리는 Florell 등²¹⁾의 방법을 변형하여 시행되었다. 상기한 방법으로 약물을 투여하고 난소 조직을 적출하였다. 적출된 조직은 막자사발로 파쇄한 후, Trizol reagent(invitrogen, Cat# 15596-026)을 이용하여 total RNA를 분리하였으며, 실험 과정은 Qiagen에서 제시한 방법에 따라 이루어졌다.

5) RNA 추출 정도 관리

Total RNA를 아가로스겔 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 RNA이며²²⁾, 이 RNA 상태를 확인하기 위해 Agilent사의 Bioanalyzer 2100을 사용하여 rRNA ratio(28S/18S ribosomal RNA)를 확인함으로써 판정하였다.

6) DNA 칩을 이용한 실험

Rat Genome Microarray Kit(Agilent Technology, U.S.A)을 이용하여 실험을 수행하였다. 정도 관리를 통과한 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고, cDNA로부터 dsDNA를 합성하였다. dsDNA로부터 형광이 표지된 cRNA를 합성하고,

이를 Agilent Hybridization oven(Agilent Technology, USA)에서 DNA 칩에 반응시켰다. 형광 표지된 cRNA 제작시 20 μ g의 total RNA를 사용하였다. 어레이를 씻어낸 후 ScanArray scanner(Perkin-Elmer, Boston, MA)로 스캔하였으며, 정상 RNA를 레퍼런스로 사용하여 DNA 칩상의 대다수 cDNA spots(85% 이상)이 검출됨을 확인하였다.

7) 데이터분석

이미지파일에서 IMAGEGENE 4.0(Bio-discovery, Marina del Rey, CA)를 사용하여 1차 데이터를 얻은 후 locally weighted scatterplot smoothing method(LOWESS)를 사용하여 표준화하였다²³⁾. 모든 칩상의 spot에서, 각 채널의 형광 강도가 배경의 형광 강도보다 1.4배 더 큰 경우에만 제대로 측정된 것으로 판단하여 선별하였고, 시료에서 제대로 측정되지 않은 것은 제외시켰다. 발현 비율은 Cluster를 이용하여 순차적 클러스터링한 후 TREEVIEW(M.B. Eisen, <http://rabam.lbl.gov>)²⁴⁾를 이용하여 시각화하였다.

유전자 기능분석은 FatiGo algorithms(<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.unleashedinformatics.com>)에서 얻어진 흰쥐 단백질 데이터베이스로 cytoscape program(버전 2.4)을 이용하여 분석하였다.

3. 통계 처리

DNA 칩을 이용한 실험에서 발현 증

가 및 감소된 유전자의 유의성 검증은 Chi-square test를 이용하여 p-value<0.05 일 때 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 추출된 RNA의 정도 관리 결과

정상군(normal group)은 1.03 μ g/ μ l, 대조군(control group)은 0.54 μ g/ μ l, 실험군(GS group)은 0.97 μ g/ μ l이었으며, 전기영동 결과상에서 동일한 위치에 밴드가 관찰되어 유전자 분석을 위해 필요한 조건을 충족하였다(Fig. 1).

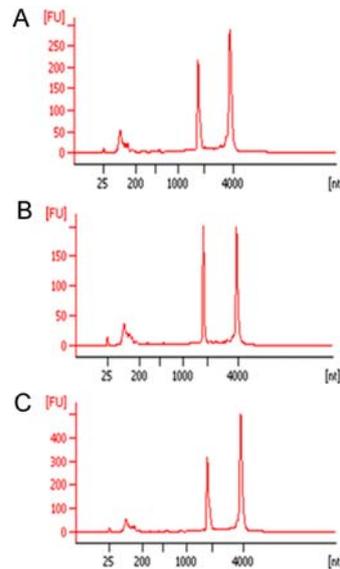


Fig. 1. Peak pattern of RNA. Quality of total RNA extracted from ovarian tissue in PCOS rats. (A) Normal group, (B) Control group, (C) GS group. RNA was extracted by using Trizol reagent. The quality and quantity was measured by spectrophotometric absorbance and migration pattern of RNA.

2. DNA 칩 발현 프로파일

대부분의 유전자들은 실험군 및 대조군에서 유사한 발현 패턴을 보였으나 일

부의 유전자는 대조군과 실험군에서 서로 다른 발현 패턴을 나타냈다. 이러한 유전자 발현 패턴을 6가지의 군으로 분류 하였다. 즉, (A) 정상군과 비교하여 대조군에서 증가하였으나 실험군에서 정상군 보다 감소한 유전자, (B) 대조군에서 증가하고, 실험군에서는 정상군 수준의 발현을 보인 유전자, (C) 대조군에서 증가하고 실험군에서도 정상군 보다 증가한 유전자, (D) 대조군에서 감소하였으나 실험군에서 정상군 보다 증가한 유전자, (E) 대조군에서 감소하고 실험군에서도 감소한 유전자, (F) 대조군에서 감소하였으나, 실험군에서 정상군과 유사한 수준의 발현율을 보인 유전자 등으로 분류하였다(Fig. 2).

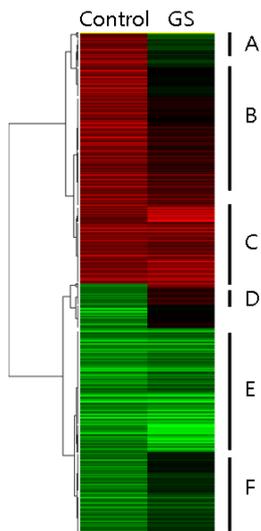


Fig. 2. Expressional profile of microarray. The normalized ratios were hierarchically clustered by using CLUSTER and then visualized using TREEVIEW program. Red, green, and black color represents up-regulation, down-regulation, and no change of gene expression, respectively. The color intensity correlates with expression level of the gene.

3. DNA 칩 발현 프로파일 상의 유전자

발현 양상 세부 분석

Fig. 2에서 제시한 6개 군에 속하는 유전자의 실질적 발현 양상 변화를 살펴본 결과 주로 B, C, E, F군이 많았고, A, D군에는 비교적 소수의 유전자가 해당되었다. 총 2902개의 유전자가 선택되었고, A군에 44개, B군에 985개, C군에 443개, D군에 37개, E군에 660개, F군에 733개의 유전자가 해당되었다(Fig. 3).

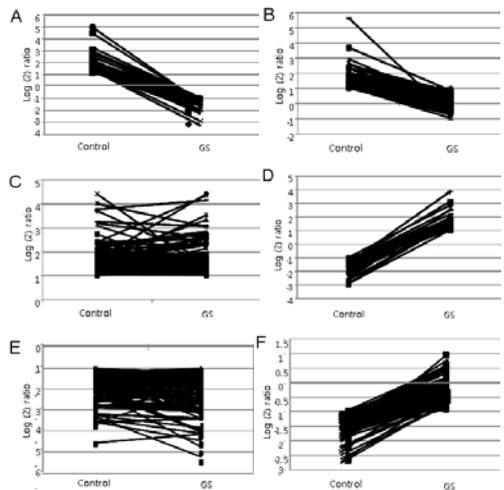


Fig. 3. Expression of genes in 6 subclasses defined in microarray.

(A) gene increased in control and decreased than normal level in GS group, (B) increased in control and restored to normal level in GS group, (C) increased in control and GS group, (D) decreased in control and increased than normal level in GS group, (E) decreased in control and GS group, (F) decreased in control and restored to normal level in GS group.

4. B군에 속한 유전자들 관련 대사 경로 분석

PCOS 유발에 의하여 발현이 증가하였다가 鬚角刺 처리에 의하여 정상군 수준으로 회복된 유전자들로 구성된 B군을 대상으로 이 유전자들과 관련된 생체 대

사 경로를 분석한 결과 Graft-versus-host disease, Allograft rejection, Autoimmune thyroid disease, Cytokine-cytokine receptor interaction, Small cell lung cancer, Type I diabetes mellitus 경로와 관련된 유전자가 유의한 수준으로 많았다(Fig. 4).

	Name	ID	pSize	pG
1	Graft-versus-host disease	05332	35	0.03311004
2	Allograft rejection	05330	38	0.03972329
3	Autoimmune thyroid disease	05320	41	0.03998620
4	Cytokine-cytokine receptor int	04060	151	0.04367126
5	Small cell lung cancer	05222	61	0.04413304
6	Type I diabetes mellitus	04940	45	0.04656782
7	Cell cycle	04110	83	0.08467568
8	Gap junction	04540	76	0.10039799
9	Focal adhesion	04510	150	0.10283018
10	Complement and coagulation cas	04610	60	0.10859623

Fig. 4. Integrated analysis of pathway on genes in B group.

To measure the effects of genes in B group on biological pathway, integrated approach was performed using signalling pathway impact analysis(SPIA) algorithm.

5. F군에 속한 유전자들 관련 대사 경로 분석

PCOS 유발에 의하여 발현이 감소하였다가 梘角刺 처리에 의하여 정상군 수준으로 회복된 유전자들로 구성된 F군을 대상으로 이 유전자들과 관련된 생체 대사 경로를 분석한 결과 Antigen processing and present, Adipocytokine signalling pathway, Focal adhesion, ECM-receptor interaction, Pancreatic cancer, Notch signalling pathway, Tight junction 경로와 관련된 유전자가 유의한 수준으로 많았다(Fig. 5).

	Name	ID	pSize	pG
1	Antigen processing and present	04612	59	0.002579204
2	Adipocytokine signaling pathwa	04920	60	0.002803664
3	Focal adhesion	04510	150	0.004965534
4	ECM-receptor interaction	04512	59	0.018324110
5	Pancreatic cancer	05212	62	0.022134888
6	Notch signaling pathway	04330	30	0.043964748
7	Tight junction	04530	103	0.048169672
8	p53 signaling pathway	04115	47	0.066084247
9	Leukocyte transendothelial mig	04670	92	0.069264574
10	Regulation of actin cytoskelet	04810	158	0.071475420

Fig. 5. Integrated analysis of pathway

on genes in F group.

To measure the effects of genes in F group on biological pathway, integrated approach was performed using signalling pathway impact analysis(SPIA) algorithm.

6. B군에 속한 유전자들의 상호작용 네트워크 분석

PCOS 유발에 의하여 발현이 증가하였다가 梘角刺 처리에 의하여 정상군 수준으로 회복된 유전자들로 구성된 B군에 속한 유전자들에 의하여 발현되는 단백질들을 인체 시스템 내에 존재하는 단백질 네트워크를 이용하여 분석한 결과 c-Fos, c-Myc, ABL1 등의 유전자가 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다(Fig. 6).

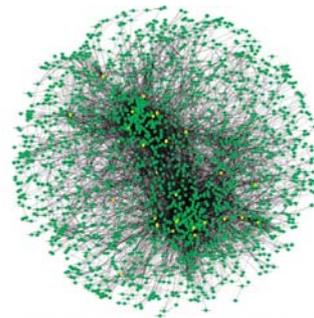


Fig. 6. Protein interactions between genes in B group.

The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database. Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be changed by treatment with GS. Lines mean the protein-protein interactions.

7. F군에 속한 유전자들의 상호작용 네트워크 분석

PCOS 유발에 의하여 발현이 감소하였다가 梘角刺 처리에 의하여 정상군 수준으로 회복된 유전자들로 구성된 F군

에 속한 유전자들에 의하여 발현되는 단백질들을 인체 시스템 내에 존재하는 단백질 네트워크를 이용하여 분석한 결과 MAPK8, RASA1, CALR 등의 유전자가 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다(Fig. 7).

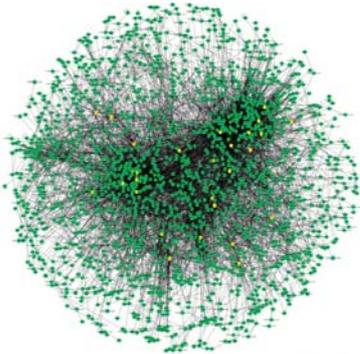


Fig. 7. Protein interactions between genes in F group.

The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database. Circles represent proteins that involved in interactions with other proteins. Yellow circles represent the proteins identified in this experiment to be changed by treatment with GS. Lines mean the protein-protein interactions.

IV. 고찰

PCOS는 가임기 여성들에게 비교적 흔한 내분비질환의 하나로서 가임기 여성들 중 5~15% 정도의 발병률을 보이며, 안드로겐의 과다, 배란장애 및 불임, 무월경 혹은 희소월경, 비만, 다모증, 탈모, 다낭성 소견의 난소양상 등의 특징적인 소견으로 가진다^{1,24)}. PCOS의 진단은 초음파의 보급과 더불어서 특징적 다낭성 소견의 난소양상을 진단에 적용하기도 하였으나, 초음파 소견이 특징적이지 않은 경우도 많아 다음과 같은 기준

이 제안되고 있다. 먼저 NIH기준은 1) 고안드로젠증 또는 고안드로젠혈증, 2) 만성 무배란증, 3) 고프로락틴혈증, 갑상선질환, 선천부신 과형성 등과 같은 관련 질환의 배제 등으로 정의하고 있고²⁵⁾, ESHRE/ASRM의 기준은 1) 희소배란 혹은 무배란, 2) 고안드로젠증의 임상적인 또는 생화학적인 징후, 3) 다낭성 난소 소견 등의 3가지 중 2가지 이상을 포함하면서 다른 질환을 배제하는 경우로 다낭성 난소의 소견은 2~9mm인 난포가 12개 이상이거나 난소의 용적이 10 ml를 넘는 경우로 정의 하였다²⁵⁻²⁷⁾.

PCOS의 서양 의학적 치료는 안드로겐 과다로 인한 다모증, 여드름, 탈모 등의 증상을 최소화하고, 월경불순, 불임 등의 원인이 되는 배란장애를 개선하며, PCOS로 유발될 수 있는 당뇨병(제2형), 대사증후군, 심혈관 질환, 암 등의 예방을 목적으로 한다. 이에 따라서, 경구 피임약, 인슐린저감제, clomiphene같은 배란유도제, 항안드로젠제 복용 등의 치료법을 사용하고 있으나^{1,28)}, 근본적인 치료법이 아닌 일시적인 증상 개선효과일 뿐이므로 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

PCOS는 한의학에서 증상에 따라 經閉, 月經不調, 無子, 肥胖, 不妊, 多毛 등의 범주로 인식하여 치료해왔다. 변증에 있어서 吳⁶⁾ 등은 腎虛, 肝鬱化火, 痰濕阻滯, 氣滯血瘀, 陰虛內熱 등으로 분류했는데, 腎虛型에는 免絲子, 胡虜巴, 熟地黃, 鹿角膠, 淫羊藿 등을 主藥으로 하였고, 肝鬱化火型은 龍膽瀉肝湯을 주로 사용하였으며, 痰濕阻滯型은 蒼附導痰湯加減方을, 氣滯血瘀型은 桃紅四物湯加減方을, 陰虛內熱型에는 瓜石散加減方을 주로 활용

하였다. 施⁸⁾ 등은 氣血兩虛, 脾腎陽虛, 肝火, 痰實 등으로 인식하여 치료하였으며, 肝火型에는 龍膽瀉肝湯加減方을, 氣血兩虛型에는 歸脾湯을 加減하였고, 脾腎陽虛型에는 附桂八物丸加減을, 痰實型에는 皂角刺, 穿山甲, 香附子, 丹蔘 등을 활용하였다.

皂角刺는 콩과(*Leguminosae*)에 속한 落葉喬木인 조각자나무(*Gleditsia sinensis* Lam), 주엽나무(*G. japonica* var. *korainensis* Naki)의 가시를 건조한 것으로, 《本草圖經》에 처음 수록되었으며, 辛溫無毒하고, “治癰疽之潰能引至潰處”, “能引諸藥上行治上焦病”하여 消腫, 托毒, 排膿, 祛風殺蟲하는 효능을 가지고 있어, 癰疽, 瘡腫, 神經痛, 關節炎 등의 각종 염증성 질환에 치료제로 임상에서 사용되고 있으며, 癥瘕結塊, 胎衣不下 등의 증상에도 병증에 따라 사용할 수 있다^{9,10)}. 현재까지 알려진 皂角刺의 주성분으로는 7종의 *Gleditschia* saponin, amino acid, flavonoid glycoside, phenol류 등이 보고 되고 있으며¹²⁾ 皂角刺單味에 대한 실험적 연구로는 정¹¹⁾ 등의 만성 비세균성 전립선염의 세포조직 및 혈액에 대한 작용, 이¹²⁾ 등의 항산화작용 및 항돌연변이 작용, 박¹³⁾ 등의 소염작용, 박¹⁴⁾ 등의 인간유래 악성 종양에 대한 작용 등에 대한 연구 등이 보고되었다¹¹⁻¹⁴⁾.

기존의 PCOS와 관련된 연구로는 양¹⁵⁾ 등의 蒼附導痰湯, 유¹⁶⁾ 등의 腎氣丸合蒼附導痰湯, 남¹⁷⁾ 등의 定經湯, 이¹⁸⁾ 등의 歸脾湯, 김¹⁹⁾ 등의 蒼附六君湯 등의 연구가 있으며, 단미제에 대한 실험으로는 박²⁰⁾ 등의 紅蔘추출물 등에 관한 연구가 있다.

이에 저자는 痰實型的 PCOS에 사용

되며, 항암효과로 난소의 이상조직 발생을 억제해 줄 가능성이 있는 皂角刺 추출물을 이용하여 PCOS에 유의한 효과가 있는지 확인하고, 그 기전을 유전자 분석 및 유전자 상호 네트워크 분석을 통하여 확인해보고자 본 실험을 실시하였다.

본 연구에서는 皂角刺가 PCOS가 유발된 흰쥐에서 적출된 난소 조직의 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 적출된 난소에서 total RNA를 추출한 다음 cRNA를 제작하고, 이를 DNA microarray analysis를 통하여 분석하였다.

유전자 발현 정도의 측정은 total RNA를 분리하여 cRNA를 제작한 다음 cRNA를 chip에 적용함으로써 이루어진다. 따라서, 세포로부터 추출된 total RNA의 순도와 함량은 실험 결과에 직접적인 영향을 미칠 수 있다^{29,30)}. total RNA의 Quality Control에는 RNA Integrity Number(RIN) 값이 사용되는데, RIN 값은 migration 및 peak pattern, 28s/18s ribosomal RNA의 비율을 근거로 한 통계적인 수치로서 1 ~ 10의 범위를 가지며, 진핵생물 total RNA samples의 quality 지표로 사용되고 있다. High quality 시료를 요하는 DNA microarray analysis를 위한 권장 값은 일반적으로 7 이상이다³¹⁾. 본 연구의 결과에서 皂角刺 처리 후 세포로부터 얻어진 total RNA를 전기영동으로 migration 시킨 결과 28s/18s의 비가 normal, control 과 GS군이 각각 2.1, 1.6과 1.6을 기록하였고 RIN 값은 모두 9.6으로 계산되어 total RNA가 분석에 적합한 상태임을 알 수 있었다(Fig. 2).

질적 평가를 통과한 total RNA를 이

용하여 형광이 표지된 cRNA를 합성한 다음, DNA 칩을 이용하여 유전자발현 정도를 측정하였다. 이 때 hybridization 과 스캐닝 과정을 거쳐 cy3와 cy5 각각의 형광강도가 측정되는데, 이러한 기초 자료는 그대로 분석에 사용할 수 없다. 신호 강도가 약한 경우 경미한 발현 정도의 차이만으로도 유의성이 있는 것처럼 보일 수 있기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 신호 비와 신호 강도를 정규분포가 되도록 보정하는 작업(normalization)을 시행한 후 통계 분석을 수행하였다(data not shown).

칩에서 얻어진 raw data를 표준화 한 후, 본격적인 분석 작업을 시행하였는데, 발현증가의 경우 2배 이상, 발현감소의 경우 1/2 이하의 발현량을 보일 때를 증가 감소의 기준으로 삼았다. 그 결과 대부분의 유전자들은 실험군 및 대조군에서 유사한 발현 패턴을 보였으나 일부의 유전자는 대조군과 실험군에서 서로 다른 발현 패턴을 나타냈다. 이러한 유전자 발현 패턴을 6가지의 군으로 분류하였다(Fig. 2). 皂角刺 처리에 의하여 발현이 변화한 유전자들을 발현 양상별로 심층 분석한 결과 총 2902개의 유전자 중에서 A군에 44개, B군에 985개, C군에 443개, D군에 37개, E군에 660개, F군에 733개가 해당되어 B, C, E, F 군이 많았고, A, D군에는 비교적 소수의 유전자가 해당되었다(Fig. 3). 이는 PCOS 유발에 의하여 총 1472개의 유전자가 발현 증가하였고, 1430개의 유전자가 발현 감소하였으며, 발현이 증가한 유전자들 중 987개의 유전자는, 皂角刺의 처리에 의하여 발현이 정상 수준으로 되돌아가거나, 정상 보다 더 감소하였고, 발현 감소한 1430

개의 유전자 중에서 770개의 유전자가 정상 수준으로 회복되거나 정상 수준 이상으로 발현이 증가했음을 의미한다. 이러한 6개 군 중에서 질병의 회복에 직접적으로 관여할 가능성이 높은 B군과 F군, 즉, PCOS 유발에 의하여 발현이 증가하였으나, 皂角刺 투여에 의하여 정상 수준으로 돌아간 유전자군과 PCOS 유발에 의하여 발현이 감소하였다가 皂角刺 투여에 의하여 정상수준으로 회복된 유전자군을 대상으로 다음의 심층 분석을 시행하였다.

본 연구의 결과에서 B군에 속한 유전자들과 관련된 생체 내 대사경로를 분석해본 결과 장기 이식 과정에서 여러 가지 면역학적 문제를 일으키는 기전인 Graft-versus-host disease와 Allograft rejection, 그리고 대표적 자가면역 질환의 일종인 Autoimmune thyroid disease, 면역계 활성화의 과정인 Cytokine-cytokine receptor interaction, 그리고, 본 연구의 결과와 크게 관련은 없지만, 항암작용의 증거로 볼 수 있는 Small cell lung cancer 경로와 관련된 유전자가 유의한 수준으로 많았다(Fig. 4). 본 연구의 결과에서 면역계가 비정상적으로 활성화 되어 발생하는 질환인 이식편 대 숙주 반응, 이식 거부, 자가 면역성 갑상선 질환 등에 관련된 유전자들 중에서 주요한 변화를 보인 유전자로는 IL-6, CD28 관련 유전자 등을 들 수 있다. IL-6는 TNF- α , 렙틴, 레지스틴, 아디포넥틴 등과 함께 아디포카인(adipokine)에 속하며, 당뇨병 환자에서 IL-6, TNF- α 의 농도는 인슐린 저항성과 비례함이 알려져 있으며, PCOS의 혈중 농도 역시 상승되어 있음이 알려져 있다³²⁾. 따라서, 이러한 결과는 PCOS

에서 증가되어 있는 IL-6를 皂角刺의 투여로 낮추어 줄 수 있다는 가설을 세울 수 있으며, 명확한 기전에 대한 후속연구가 필요하리라 생각된다. CD28은 T 세포 표면에 존재하는 표면 항원으로 T 세포가 항원제시세포(Antigen presenting cell)가 제시한 항원을 인식할 때, 보조자로서 T 세포 활성화에 중요한 역할을 한다³³⁾. 따라서, 皂角刺가 CD28의 발현을 정상 수준으로 낮추어 준 것은 皂角刺가 과 항진된 면역기능을 정상화 시킬 수 있는 기전의 한 가지로 해석될 수 있다. 이에 부가하여, Type I diabetes mellitus 경로와 관련된 유전자가 PCOS 유발에 의하여 발현 증가하였다가 皂角刺 투여에 의하여 정상 수준으로 돌아왔음을 알 수 있었는데, 이는 다낭성 난소 질환에 수반되는 고인슐린혈증 및 대사성당뇨질환³⁴⁾에 皂角刺의 활용 가능성 및 기전 관련 연구에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

PCOS 유발에 의하여 발현이 감소하였다가 皂角刺 처리에 의하여 정상군 수준으로 회복된 유전자들로 구성된 F군과 관련된 생체 대사 경로를 분석한 결과 면역 기능 활성화와 조절에 관여하는 Antigen processing and presentation, 아디포카인의 생성에 관여하는 Adipocytokine signalling pathway, 세포 성장 및 분화에 관여하는 Focal adhesion 등의 경로와 관련된 유전자가 유의한 수준으로 많았다(Fig. 5). 이러한 경로에 관여하는 대표적인 유전자들로는 세포성 면역에 중요한 역할을 담당하는 Major histocompatibility complex (MHC) class I, 세포내 신호 전달 체계에서 중요한 역할을 하는 c-Jun N-terminal kinases(JNK), Akt, 세포 성장 및 분화

에 중요한 Actin 등으로 주로 생체의 생명 유지에 반드시 필요한 유전자들이 주로 포함되어 있었다. 특히, Adipocytokine signalling pathway에 관련해서 F군의 결과는 전반적인 Adipocytokine에 의해 인슐린 저항성이 발생하는 경로와 관련 있는 유전자군을 분석한 것으로, 작용기전을 자세히 살펴보면, 인슐린 저항성을 증가시키는 군과 인슐린 저항성을 감소시키는 두 체계 모두에 관여하고 있는 것을 알 수 있다. 이러한 결과만으로는 명확한 해석이 불가능 하며, 추후 후속 연구를 통하여 명확한 기전을 규명해야 할 것으로 생각된다.

유전자 발현의 증가 또는 감소는 결국 그 유전자가 만들어 내는 단백질의 증가 또는 감소로 이어진다. 따라서, 이러한 유전자들에 의하여 발현되는 단백질들을 인체 시스템 내에 존재하는 단백질 네트워크를 이용하여 분석해 보면 PCOS에서 皂角刺의 주요 target molecule를 확인할 수 있다. B군에 속한 유전자를 대상으로 단백질 상호작용 네트워크를 분석한 결과 원암 유전자인 c-Fos, c-Myc, ABL1 등의 유전자가 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치하고 있었다(Fig. 6).

c-Fos는 원암유전자(proto-oncogene)의 하나로, c-Jun과 결합하여 전사인자인 AP-1을 형성하며³⁵⁾, 일반적으로 과 항진된 AP-1은 악성 종양을 의미 한다³⁶⁾. c-Myc은 Burkitt's lymphoma 환자에게서 최초로 발견되었으며, 변이가 일어나거나, 과 항진 되었을 때 암을 일으키는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL1) 역시 원암 유전자로 만성골수구성백혈병(chronic

myelogenous leukemia)에서 자주발견 된다³⁸⁾. 이러한 결과는 난소조직의 증식이나, 난소 조직의 파괴에 따른 보상에 의한 현상으로 해석되며, 이러한 유전자 이외에도 기본적인 세포 증식 및 분화과정에 관여하는 Cyclin-A2(CCNA2), G2/mitotic-specific cyclin-B1(CCNB1) 등이 포함되어 있었다.

F군에 속한 유전자들과 관련된 단백질 네트워크를 분석한 결과 일반적인 세포 대사에 광범위하게 관여하는 Mitogen-activated protein kinase 8(MAPK8), 세포의 성장 및 분화 속도 조절에 관여하는 RAS p21 protein activator 1(RASA1), 칼슘 이온의 이동에 관여하는 Calreticulin (CALR) 등의 유전자가 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다(Fig. 7).

MAPK8는 MAP kinase family의 일종으로, 세포의 성장, 증식, 분화 등 다양한 과정에 관여하는 중요한 단백질이다³⁹⁾. 반면에 MAPK8는 tumor-necrosis factor α (TNF- α) 또는 자외선 등의 자극으로부터 활성화되어 세포를 apoptosis에 이르게 하는 기전에도 작용한다고 알려져 있다⁴⁰⁾. 본 연구의 결과를 살펴보면, PCOS 유발에 의하여 MAPK8의 발현이 감소한 것은 난소조직의 전반적인 세포 대사의 감소에 기인한 것으로 생각되어지며, MAPK8의 발현이 정상 수준으로 회복된 것은 상기한 세포 대사의 감소가 皂角刺 투여에 의하여 억제된 것으로 해석된다.

RASA1 역시 세포의 분화 및 성장의 조절에 있어서 중요한 단백질로 RASA1이 기능을 상실하면 basal cell carcinoma를 유발시킨다는 사실이 알려져 있다⁴¹⁾. RASA1 유전자가 皂角刺에 의하여 정상

수준으로 회복된 것은 난소조직의 비정상적 증식과 같은 현상을 억제하여 궁극적으로는 암의 발생을 예방할 수 있는 가능성이 있다고 해석할 수 있다.

CALR은 칼슘과 결합하여 칼슘의 이동에 관여하는 단백질을 코딩하는 유전자로 3차구조가 손상되었거나 잘못된 당단백과 결합하여 궁극적으로 해당 당단백을 파괴하는 역할을 한다⁴²⁾. 본 연구의 결과에서 皂角刺가 CALR의 발현 수준을 정상으로 회복시킨 것은 생체 내에서 일어날 수 있는 각종 손상 또는 전사 오류로부터 세포를 보호할 수 있을 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과를 통하여 본 저자는 皂角刺가 PCOS에서 난소의 이상 증식 또는 암 발생 등을 억제해 줄 가능성을 제기하는 바이며, 그 기전으로는 c-Fos, c-Myc, ABL1와 같은 과발현된 원암 유전자군의 정상화 및 RASA1과 같은 세포 증식 조절작용 관련 유전자를 정상수준으로 회복시키는 등의 과정에 관여할 것으로 생각된다. 또, 증가된 IL-6, Type I diabetes mellitus 경로 등의 정상화는 PCOS에 수반되는 고인슐린혈증의 치료에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고, 향후 PCOS 이외에도 세포의 이상 증식으로 발생할 수 있는 癥瘕 등의 질환에 응용해 볼 수 있을 것이라는 가능성을 제기하는 바이며, 향후 이에 대한 지속적인 실험 및 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

皂角刺 추출물이 PCOS가 유발된 흰쥐

의 난소 조직에서 유전자 발현 양상에 미치는 영향을 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 皂角刺 처리 후 세포로부터 얻어낸 total RNA를 전기영동으로 migration 시킨 결과 28s/18s의 비가 normal, control과 GS군이 각각 2.1, 1.6과 1.6을 기록 하였고 RIN 값은 모두 9.6이었다.
2. 발현 변화를 보인 유전자를 A ~ F 6개 군으로 나누어 분석한 결과 A군에 44개, B군에 985개, C군에 443개, D군에 37개, E군에 660개, F군에 733개의 유전자가 해당되었다.
3. PCOS 유발에 의하여 발현이 증가하였다가 皂角刺 처리에 의하여 정상군 수준으로 회복된 유전자들(B군)과 관련된 생체 대사 경로로는 Graft-versus-host disease, Allograft rejection, Autoimmune thyroid disease, Cytokine-cytokine receptor interaction, Small cell lung cancer, Type I diabetes mellitus가 선정되었다.
4. PCOS 유발에 의하여 발현이 감소하였다가 皂角刺 처리에 의하여 정상군 수준으로 회복된 유전자들(F군)과 관련된 생체 대사 경로로는 Antigen processing and present, Adipocytokine signalling pathway, Focal adhesion, ECM-receptor interaction, Pancreatic cancer, Notch signalling pathway, Tight junction가 선정되었다.
5. B군에 속한 유전자들에 의하여 발현되는 단백질을 인체 시스템 내에 존재하는 단백질 네트워크를 이용하여 분석한 결과 c-Fos, c-Myc, ABL1 등의 유전자가 단백질 상호작용 네트워

크의 중심에 위치함을 알 수 있었다.

6. F군에 속한 유전자들에 의하여 발현되는 단백질을 인체 시스템 내에 존재하는 단백질 네트워크를 이용하여 분석한 결과 MAPK8, RASA1, CALR 등의 유전자가 단백질 상호작용 네트워크의 중심에 위치함을 알 수 있었다.

□ 투 고 일 : 2010년 4월 28일

□ 심 사 일 : 2010년 5월 4일

□ 심사완료일 : 2010년 5월 12일

참고문헌

1. 민응기. 다낭성 난소 증후군. 대한산부인과학회지. 2008;51(8):805-19.
2. Stein IF, Leventhal NL. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol. 1935;29:181-91.
3. 陳貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京:中國醫學科技出版社. 1991:1004-9.
4. 張鳳輝, 薛耀. 中醫藥治療多囊卵巢綜合症方法初探. 新中醫. 1991;1:14-6.
5. 周羽珍, 蔡小蓀. 蔡小蓀治療婦科癩疾驗方拾萃. 江蘇中醫. 1996;17(1):9-10.
6. 吳桂芳, 李祥云. 中醫藥治療多囊卵巢綜合症研究概況. 河南中醫. 1994;14(2):123-5.
7. 金維新. 不孕症的診斷與中醫治療. 北京:北京科學出版社. 1992:172-7.
8. 施令義. 中西醫結合研究學術論文編. 婦產科專輯. 1983;10:32.
9. 전국한의과대학본초학편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2004:481-2.

10. 김인락. 皂莢과 皂角刺의 기원에 대한 연구. 대한본초학회지. 2006;21(1):44-9.
11. 정기훈 등. 皂角刺가 만성 비세균성 전립선염 Rat 모델에서 혈액 및 세포조직의 변화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2007;28(4):779-90.
12. 이신규 등. 皂角刺의 향돌연변이 및 항산화 활성에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):215-22.
13. 박용기, 강병수. 皂角刺의 소염작용에 대한 실험적 연구. 동국대학교 한의학연구소논문집. 1995;3:237-65.
14. 박용호 등. DNA chip을 이용한 皂角刺 추출물의 인간유래 악성 종양에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2008;21(1):55-69.
15. 양승정 등. 蒼附導痰湯이 Estradiol Valerate로 유발된 백서의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002;15(2):1-11.
16. 유영기 등. 腎氣丸合蒼附導痰湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):84-98.
17. 남은정 등. 定經湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(1):99-113.
18. 이연경 등. 歸脾湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2008;21(3):60-74.
19. 김희주 등. 蒼附六君湯이 Estradiol Valerate로 유도된 흰쥐의 다낭성 난소에 미치는 영향. 2008;21(2):1-16.
20. Pak SC et al. Effect of Korean red ginseng extract in a steroid-induced polycystic ovary murine model. Arch Pharm Res. 2009;32(3):347-52.
21. Caillol M et al. Pituitary and ovarian responses to luteinizing-hormone-releasing hormone during pregnancy and after parturition in brown hares (*Lepus europaeus*). J Reprod Fertil. 1991;92(1):89-97.
22. Florell SR et al. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. Mod Pathol. 2001;14(2):116-28.
23. Weis S et al. Quality control for microarray analysis of human brain samples: The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. J Neurosci Methods. 2007;165(2):198-209.
24. 김 탁. 다낭성 난소 증후군의 최신지견. 대한산부인과학회 연수강좌. 2002;31:38-44.
25. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, editors. Polycystic Ovary Syndrome. 3rd ed. Boston: Blackwell Scientific Publications. 1992;377-84.
26. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2004;81:19-25.
27. The Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS consensus workshop

- group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome(PCOS). *Hum Reprod.* 2004;19:41-7.
28. 노정현. 다낭성 난소 증후군의 진단과 치료. 대한내분비학회. 연수강좌. 2007;58-66.
29. Kimizuka F, Kato I. DNA chip technologies and their applications: towards functional genomics. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1998;43(13):2004-11.
30. Sokol DL et al. Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(20):11538-43.
31. Schroeder A et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7:3.
32. 김영아 등. 다낭성 난소 증후군 환자의 아디포넥틴, TNF- α , IL-6 농도와 인슐린 저항성의 관계. *당뇨병.* 2006;30(2):104-11.
33. Woerly G et al. "Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines(interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes". *J Exp Med* 1999;190(4):487-95.
34. 황주연, 이병석. 다낭성 난소 증후군과 인슐린 저항성. *대한산부인과학회지.* 2006;49(6):1179-87.
35. D'Alonzo RC et al. "Physical interaction of the activator protein-1 factors c-Fos and c-Jun with Cbfa1 for collagenase-3 promoter activation". *J. Biol. Chem.* 2002;277(1):816-22.
36. Lee S K et al. "Activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor as novel target molecules of the cancer-amplified transcription coactivator ASC-2". *Mol. Endocrinol.* 2000;14(6):915-25.
37. Soucek L et al. "Modelling Myc inhibition as a cancer therapy". *Nature (London, UK: Nature Publishing Group.* 2008;455:679-83.
38. Quintás-Cardama A, Cortes J. Therapeutic options against BCR-ABL1 T315I-positive chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2008;14(14):4392-9.
39. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 2004;23(16):2838-49.
40. Derijard B et al. "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain". *Cell* 1994;(6):1025-37.
41. Rosell R et al. Influence of genetic markers on survival in non-small cell lung cancer. *Drugs Today(Barc).* 2003;39(10):775-86.
42. Andrin C et al. "Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules". *Biochemistry.* 1998;37(29):10386-94.
-