

신문혈 자침이 어린 백서 해마의 단백질 발현에 미치는 영향

배창환 · 김동수 · 김승태

부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부

Proteomic Changes by Acupuncture Stimulation at HT7 in the Hippocampus of Rat Pups

Chang-Hwan Bae, Dong-Soo Kim, Seung-Tae Kim

Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University

Abstract

Objectives : Hippocampus, a region of temporal lobe, plays an important role in the pathogenic mechanisms of brain diseases such as Alzheimer's disease, depression and temporal lobe epilepsy. This research is designed to investigate hippocampal changes after acupuncture stimulation at *Shinmun*(HT7) using 2-dimensional gel electrophoresis(2-DE).

Methods : On postnatal-day 15, rat pups were randomly divided into *Normal*(NOR) or HT7 group. All of Pups kept with their mothers for 7 days, but pups in HT7 group received acupuncture stimulation at HT7 daily. On postnatal-day 21, hippocampus of each rat pup was dissected 30 minutes after last acupuncture stimulation and the protein expressions were investigated using 2-DE.

Results : After acupuncture stimulation at HT7, expression of 20 proteins were significantly increased. Succinate semialdehyde dehydrogenase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like, transketolase, aconitate hydratase and phosphoglucumutase-1 were related to glucose metabolism. Eukaryotic initiation factor(eIF) 4A-II, eIF 4A-III, mitochondrial Tu translation elongation factor and chain A of crystal structure of the 70-Kda heat shock cognate protein involve in the protein synthesis in ribosome. Tubulin β -4 chain, tubulin T β -15 and tubulin α -1B chain comprise cytoskeleton. Glutathione S-transferase(GST) ω -1, GST P and GST Yb-3 can reduce oxidative stress. β -soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein is required for vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, glycerol-3-phosphate dehydrogenase plays a major role in lipid biosynthesis, creatine kinase U-type catalyses the conversion of creatine and consumes adenosine triphosphate to create phosphocreatine and adenosine diphosphate. Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha and voltage dependent anion-selective channel protein 2 were also increased.

Conclusions : The results suggest that acupuncture stimulation at HT7 may enhance glucose and lipid metabolism, protein synthesis, cytoskeletal substance and anti-oxidative stress in hippocampus.

Key words : acupuncture, acupoint, HT7, 2-dimensional electrophoresis

· Correspondence author: Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Seung-Tae Kim, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yngsan 626-870, Korea
Tel: +82-51-510-8473, Fax: +82-51-510-8437.
E-mail: kimst@pusan.ac.kr

· Received May 14, 2012, Revised May 29, 2012, Accepted June 8, 2012

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (No. 2010-0021190).

1. 서론

해마(hippocampus)는 대뇌변연계의 측두엽에 위치한 조직으로, 학습 및 기억, 감정 및 공격성 등을 담당하는 부위이다¹⁾. 많은 뇌질환에서 해마의 변화가 나타나는데, 알츠하이머병의 경우 초기에

해마의 파괴가 나타나며²⁾, 측두엽간질에서는 해마의 경화가 빈번히 나타나고³⁾, 오랜 기간의 스트레스, 외상 후 스트레스 장애, 우울증 등에서도 해마의 기능적, 구조적 이상을 유발한다⁴⁾.

神門(HT7)은 수소음심경의 원혈이자 자경사혈로, 瘧心煩, 甚欲得冷飲, 惡寒則欲處溫中, 咽乾不嗜食, 心痛數噫, 恐悸, 少氣不足, 手臂寒, 面赤喜笑, 掌中熱而哕, 目黃脇痛, 喘逆身熱, 狂悲狂笑, 嘔血吐血, 振寒上氣, 遺溺失音, 心性痴呆, 健忘, 心積伏梁, 大小人五癩 등을 치료할 수 있는 경혈이다⁵⁾. 최근 코카인 중독⁶⁾, 흡연의 금단증상 억제⁷⁾, 정신적 스트레스⁸⁾ 등 다양한 질환에 대한 이 경혈의 효능 연구가 진행되고 있으며, 모성 분리 동물 모델을 이용한 우울증 연구에 있어서도 神門 자침이 치상회의 세포 분화를 촉진시키고⁹⁾, 해마에서 neuropeptide Y를 증가시키는¹⁰⁾ 등 모성 분리로 인한 해마의 기능적, 구조적 장애를 회복시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 神門에 대한 자극이 어떠한 기전으로 해마에서 이러한 변화를 일으키는지는 아직까지 알려져 있지 않다.

비록 침 자극이 어떠한 경로를 통하여 작용 부위에 전달되는지는 알 수 없더라도, 만일 침 자극이 어떠한 질병을 낮게 한다면 그 질병이 유발되는 부위, 즉 침이 작용하는 부위에서 이로 인한 변화가 나타나야 한다. 예를 들면, 모성 분리 우울증 동물 모델에서 神門 자극이 우울증으로 인한 행동 변화를 개선하고 우울증과 관련 깊은 해마 부위에서 관련된 단백질의 발현을 변화시킨다면, 정상 동물에서도 神門 자침이 해마로 자극을 전달하여 이 부위에서 특정 단백질의 변화가 관찰되어야 하는 것이다. 물론 침 치료는 몸 안에 있는 기운의 불균형을 바로 잡아줌으로써 효과를 발휘하는 치료법이기에 때문에, 정상 상태의 동물에 자침을 하더라도 이로 인한 변화가 나타나지 않을 수도 있다. 하지만 정상 동물에 자침하였을 때 해마에서 나타나는 단백질 발현의 변화를 조사한 연구는 현재까지 없는 실정이다.

프로테오믹스는 발현되는 모든 단백질의 변화를 관찰하는 연구방법이다. 일반적으로 단백질의 변화를 관찰하는 연구방법으로서 웨스턴블롯법이 널리 사용되고 있으나, 이는 항체를 이용하여 특정 단백질의 발현을 구체적으로 조사하는 방법이기에, 특정 조직에서 나타나는 단백질 전체의 변화를 파악하기 어렵다는 단점이 있다. 프로테오믹스 기법은 이러한 단점을 보완하여 시료 전체의 단백질 변화를 일시에 파악할 수 있으며, 이를 통하여 단백질 사이의 상관관계나 작용 기전과 관련된 여러 단백질을 조사할 수 있다는 장점이 있다. 이차원 전기영동(2-dimensional electrophoresis; 2-DE)은 프로테오믹스 기법 중 하나로, 단백질이 가진 전하와 분자량의 차이를 이용하여 단백질을 분리하는 방법으로, 1차원적으로 등전점 전기영동(iso electric focusing)을 하여 단백질을 등전점으로 분리한 후, 다시 2차원적으로 SDS-전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)을 실시하여 등전점이 같은 단백질을 분자량을 기준으로 분리하는 방법이다. 본 연구는 Sprague-Dawley 백서의 神門에 생후 15일부터 7일간 자침한 후 백서의 해마에서 나타나는 단백질의 변화를 프로테오믹스 기법 중 하나인 2-DE를 이용하여 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 출산을 1주일 앞둔 임신한 암컷 Sprague-Dawley 백서(두얼바이오텍, 한국)를 구입하여 이들이 분만한 어린 백서를 사용하였다. 동물들은 한국 실험동물 관리 수칙(Guidelines of the Korean Academy of Medical Sciences)에 따라 실온(22±3°C)에서 12시간씩 낮과 밤이 바뀌는 환경에서 물과 음식(실험동물용 쥐사료, 에그리브랜드

퓨리나코리아, 한국)을 무제한으로 공급해주어 실험기간 동안 스트레스 및 환경의 변화에 따른 영향을 최소화하였다.

2. 실험군 분류 및 침치료

생후 15일 된 어린 백서들을 무작위로 정상군(normal, n=4)과 신문자침군(HT7, n=4)의 두 군으로 나누고, 분리 직후부터 1일 1회 양측 神門에 오전 11시에서 11시 30분 사이에 체중을 잰 후, 백서가 움직이지 않도록 보조실험자가 양손으로 백서의 목덜미와 꼬리를 붙잡고 나서 시술자가 양측 神門에 자침하였다. 자침 방법은 0.18×8 mm 규격의 침(동방침구사, 한국)을 1 mm 깊이로 神門에 자침하고, 2 Hz의 속도로 15초 동안 30회 염전한 후 발침하였다. 순서는 좌측에 먼저 시술한 뒤 우측에 시술하였다. 정상군은 신문자침군과 동일한 스트레스를 받게 하기 위하여 목덜미와 꼬리를 잡고 1분 동안 움직이지 않도록 고정시킨 후 풀어주었다. 모든 백서는 자침 시간 동안을 제외하고는 모두 어미와 함께 생활하였다.

3. 이차원 전기영동

1) 시료 준비

마지막 자침 30분 뒤, 동물들을 CO₂ 개스로 안락사시킨 후 바로 해마를 적출하고 바로 -80°C deep freezer에서 실험할 때까지 보관하였다. 단백질 추출을 위해 조직을 단백질 용해 완충용액(7 M urea, 2 M Thiourea, 4%(w/v)3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1%(w/v) dithiothreitol(DTT), 2%(v/v) pharmalyte, 1 mM benzamidine)과 혼합하여 homogenizer로 분쇄한 후 1시간 동안 vortex하였다. 그리고 15°C에서 15,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 시료로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford법으로 수행하였다¹¹⁾.

2) 전기영동

일차 등전점 분리를 위하여 immobilized pH gradient(IPG) strip은 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 완충용액으로 상온에서 16시간 reswelling 하였다. 시료는 strip당 200 µg씩 사용하였으며, Multiphore II electrophoresis system(GE Healthcare, 미국)을 이용하여 제조 회사의 사용매뉴얼에 따라 20°C에서 isoelectric focusing(IEF)을 실시하였다. IEF 조건은 150 V에서 3,500 V까지의 도달 시간을 3시간으로 하였으며, 3,500 V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96 kWh가 되도록 설정하였다. SDS-PAGE를 하기 전에 IPG strip을 1% DTT가 포함된 equilibration buffer(50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 incubation한 뒤 즉시 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 incubation하였다. Equilibration이 끝난 strip은 SDS-PAGE gel에 배열하고 Hoefer DALT 2D system(GE Healthcare, 미국)을 사용해 20°C에서 1.7 kWh가 되도록 전개하였다. 이차원 전기영동이 완료된 겔의 단백질은 Oakley 등¹²⁾의 방법에 준하여 coomassie brilliant blue로 염색하였으며, 염색된 이차원 겔은 Duoscan T1200 스캐너(AGFA Healthcare, 벨기에)로 스캔하여 저장하였다.

3) 이미지분석

스캔된 이미지로부터 단백질 spot의 발현량 변화를 위한 정량 분석은 PDQuest 소프트웨어(version 7.0; Bio-Rad, 미국)를 이용하여 실시했다. 각 spot의 정량은 총 유효 spot의 intensity로 평균화하였으며, 두 군을 비교할 때 통계적으로 유의한 발현량 변화를 보여주는 spot을 선정하였다(Fig. 1).

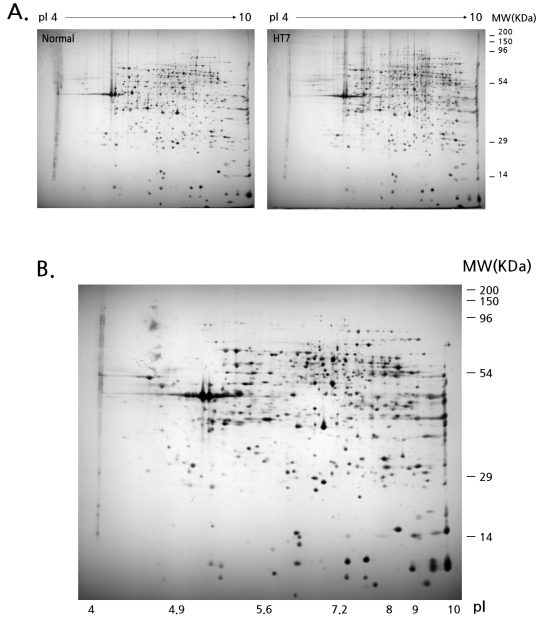


Fig. 1. (A) Hippocampal tissue protein profiles obtained over different pI ranges. (B) Representation of identified differential protein spots in 2-D gel templates between the normal and HT7 groups.

4) Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) 분석

동정한 단백질 spot을 잘라서, 트립신에 50% acetonitrile에 포화-cyano-4-hydroxycinnamic acid를 같은 양을 넣고 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)와 함께 녹인 후, Fernandez 등¹³⁾의 방법에 준하여 MALDI-TOF 분석을 실시하였다. MALDI-TOF-MS spectra는 Flex Analysis 3.0 소프트웨어(Bruker Daltonik GmbH, 독일)를 사용하여 얻었다. 단백질은 MASCOT 웹사이트(http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)에서 NCBI database를 이용하여 분석하였다.

4. 통계

모든 자료는 평균±표준오차로 표시하였으며, 모든 통계는 GraphPad Software Inc.의 Prism 5 for Windows 프로그램을 사용하여 실시하였다. 두 군 사이의 단백질 발현의 유의성은 independence t-test를 통하여 검증하였고, *p*값이 0.05보다 적은 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 神門 자침으로 인한 해마 단백질 발현의 변화

생후 15일부터 7일간 神門에 자침을 한 결과, 해마에서 정상군에 비하여 통계적으로 유의하게 변화한 단백질은 총 20개였으며, tubulin β -4 chain, β -soluble N-ethylmaleimide-NSF attachment protein(SNAP), tubulin T β -15, tubulin α -1B chain, eukaryotic initiation factor 4A-II(eIF4A-2), chain A of crystal structure of the 70-kda heat shock cognate protein(Hsc), glutathione s-transferase (GST) ω -1, cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH), mitochondrial Tu translation elongation factor(EF-Tu), eukaryotic initiation factor 4A-III(eIF4A-3), phosphoglucomutase-1, succinate-semialdehyde dehydrogenase(SSADH), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-like, platelet-activating factor acetylhydrolase(PAF-AH) IB subunit alpha, transketolase, mitochondrial acornitate hydratase, GST P, GST Yb-3, voltage dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC2), mitochondrial creatine kinase U-type였다(Table 1, Fig. 2). 변화가 나타난 모든 단백질들은 神門 자침으로 인해 발현이 증가되었으며, 발현이 감소된 단백질은 없었다.

Table 1. Protein Profiles Expressed More than Two Times after Acupuncture Stimulation at HT7

Name	MR	PI	Normal	HT7	p value
Tubulin β -4 chain	40.07	5.08	587.30±60.77	1315.14±318.93	0.0331
β -soluble NSF attachment protein	37.56	5.11	834.83±92.44	1518.72±78.23	0.0007
Tubulin T β -15	39.89	5.24	1786.37±381.39	3381.03±349.29	0.0108
Tubulin α -1B chain	42.37	5.13	614.91±85.42	1526.60±190.10	0.0023
Eukaryotic initiation factor 4A-II	49.16	5.19	536.29±185.65	1425.15±215.08	0.0102
Chain A, crystal Structure of the 70-Kda heat shock cognate protein	69.10	5.22	2475.08±228.01	3451.75±235.15	0.0123
Glutathione S-transferase ω -1	32.84	7.38	1650.67±247.44	2200.90±81.36	0.0396
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, cytoplasmic	39.00	7.17	1411.55±237.49	1997.76±92.44	0.0305
Tu translation elongation factor, mitochondrial	47.89	7.38	549.89±84.73	916.86±144.46	0.0355
Eukaryotic initiation factor 4A-III	49.59	7.41	526.07±21.38	1087.15±89.19	0.0004
Phosphoglucomutase-1	62.19	7.23	615.39±75.10	1309.98±142.15	0.0025
Succinate semialdehyde dehydrogenase	52.16	7.46	276.50±37.57	457.99±31.21	0.0050
Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase-like	40.33	9.09	2456.67±373.71	4210.46±371.97	0.0079
Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha	49.76	9.08	394.76±80.23	1223.15±315.25	0.0218
Transketolase	66.93	9.24	386.17±134.04	1365.29±477.25	0.0478
Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	77.47	9.10	818.25±150.40	1710.73±323.89	0.0233
Glutathione S-transferase P	24.87	9.32	282.97±56.52	991.17±144.43	0.0019
Glutathione S-transferase Yb-3	27.36	9.27	1093.81±406.78	2620.61±326.19	0.0132
Voltage dependent anion-selective channel protein 2	35.81	9.30	1716.96±623.27	4081.81±349.24	0.0081
Creatine kinase U-type, mitochondrial precursor	46.60	9.42	1056.54±272.95	4891.58±1322.16	0.0148

IV. 고 찰

생후 15일 된 어린 백서의 神門에 7일간 자침한 후 나타나는 변화를 이차원 전기영동을 통하여 분석한 결과, 20개의 단백질 발현이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 이 단백질들이 신체 내에서 작용하는 기전에 따라 분류해보면, 포도당 대사와 관련된 단백질이 5종으로 가장 많고 그 다음으로 리보솜의 단백질 합성에 관여하는 인자가 4종, 세포골격에 관련된 단백질이 3종, GST가 3종, 에너

지 발생과 관련된 단백질 1종, SNAP 1종, 이온채널 관련 단백질이 1종, 지질 대사 관련 단백질 1종, 혈소판의 활동 관련 인자 1종으로 분류되었다.

SSADH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-like, transketolase, aconitate hydratase, phosphoglucomutase-1 등 5종의 단백질은 포도당 대사와 관련된 단백질이다. 포도당이 체내에 흡수되면 해당 과정을 통해 2피루브산으로 바뀌고, 이는 크렘스 회로를 통하여 대사에 필요한 ATP를 추가로 생산하게 된다. SSADH는 succinate semialdehyde

신문혈 자침이 어린 백서 해마의 단백질 발현에 미치는 영향

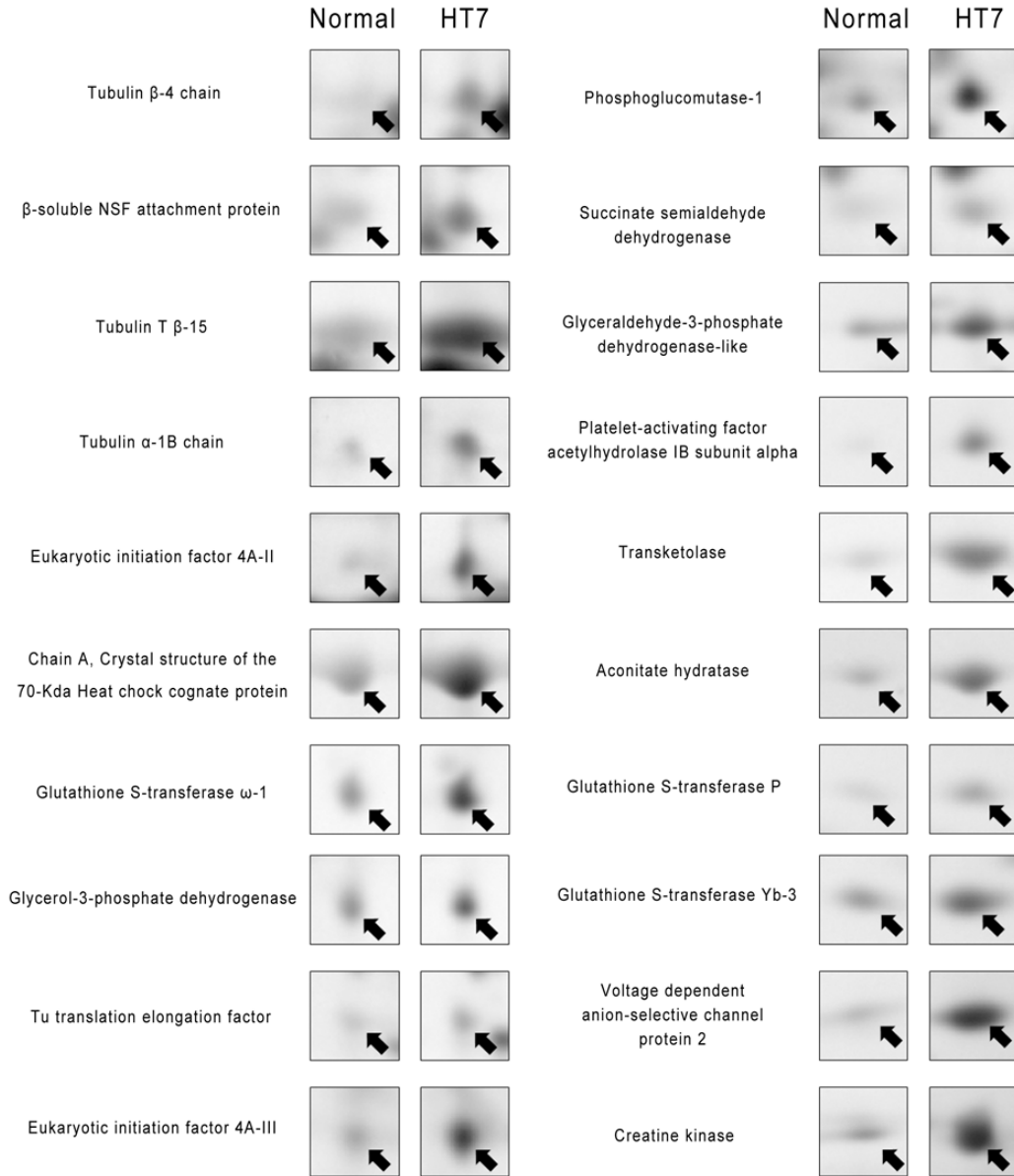


Fig. 2. Differential expression profiles of 20 proteins.

Arrowheads on cropped images of 2-dimensional gels represent protein spots that showed different changes between the normal and HT7 groups. All protein expressions are increased.

를 succinate로 대사하는 효소로 γ -aminobutyric acid(GABA)의 분해물을 해당과정으로 보내는 역할을 한다¹⁴⁾. 그러므로 이 효소는 해마의 GABA

매개 신호전달에 관여하며, 부족할 경우 succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency의 병증이 나타나게 된다¹⁵⁾. Glyceraldehyde 3-phosphate dehy-

drogenase-like는 해당작용의 glyceraldehyde 3-phosphate를 glycerate 1,3-bisphosphate로 대사하는 효소로, 철분대사, 히스톤 생합성, microtubule network의 형성 보조 등세포 내에서 다양한 기능을 한다¹⁶⁾. Transketolase는 pentose phosphate pathway의 5탄당을 해당 작용에 필요한 6탄당으로 전환시키는 효소이다. aconitate hydratase는 크렙스 회로에서 citrate를 iso-citrate로 바꾸는 역할을 하는 효소이다. phosphoglucomutase-1은 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환시키거나 그 반대로 작용하는 효소이다. 神門 자침으로 인해 이러한 단백질들이 증가하였다는 것은 神門 자침으로 인해 해마의 포도당 대사가 활성화되었다는 것을 의미한다.

eIF-4A2, eIF-4A3, EF-Tu, Hsc 등 4개의 단백질은 리보솜의 단백질 합성에 관여한다. 이중 eIF-4A2, eIF-4A3, EF-Tu는 전사 개시인자로서 리보솜에 결합하는 것으로 전사의 시작을 알려주는 역할을 하며, Hsc는 합성된 단백질이 적절한 3차원 구조를 갖도록 도와준다. 神門 자침으로 해마 조직에서 이러한 단백질들이 증가되었다는 것은 神門 자극이 mRNA의 정보 전달로 인한 리보솜의 단백질 합성을 증가시켰다는 것을 의미하는 것으로 사료된다.

Tubulin β -4 chain, tubulin T β 15, tubulin α -1B chain 3개의 단백질은 세포 골격과 관련된 단백질이다. Tubulin β -4 chain은 신경에서 발현하는 tubulin family이고, tubulin T β 15는 뇌 구조의 형성에 영향을 주는 단백질로, 이 단백질이 부족해지면 뇌 손상 등의 문제를 발생시키며¹⁷⁾, tubulin α -1B chain은 인슐린의 대사와 관련이 있다. 이들은 세포의 구조를 지지하는 역할을 하는 tubulin 단백질이라는 공통점이 있으며, 이 단백질들은 세포가 분화하여 새로운 세포가 만들어질 때 증가하게 된다. 현재까지 뇌에서 세포 분화가 일어나는 곳은 뇌실하층(subventricular zone)과 치상회(dentate gyrus)라는 것이 알려져 있으며, 이 중 치상회는

해마 부위에 존재하게 된다. 실제로 神門 자침이 우울증 동물 모델에서 해마 치상회의 세포 분화를 촉진시킨다는 것⁹⁾과 少府 자침이 간질 동물 모델에서 해마 치상회의 세포 분화를 촉진시킨다는¹⁸⁾ 연구 결과를 살펴볼 때, 이러한 세포 구조물의 증가는 神門 자침이 해마 치상회의 세포 분화를 촉진시키는 것이기 때문인 것으로 판단되나, 이와 관련한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

GST는 환원된 glutathione을 대사하는 단백질로 산화환원으로 인한 스트레스를 조절할 수 있다. GST P는 일반적인 GST의 기능처럼 환원된 glutathione의 기능을 가지면서 cdk5를 조절하여 신경퇴화를 예방하는 역할도 수행한다¹⁹⁾. GST Yb-3은 glutathione과 전자친화성 물질들과 결합하여 산화를 억제하며, GST ω -1은 산화환원상태의 항상성을 조절하고 신경 손상을 억제한다²⁰⁾. 즉 神門 자침이 GST들을 증가시킨 것은 神門 자침이 항산화 효과를 가지며 신경의 퇴화를 예방할 수 있다는 것을 의미한다.

Creatine kinase는 creatine이 adenosine triphosphate와 반응하여 phosphocreatine과 adenosine diphosphate로 변화하는데 관여하는 효소로, 세포 내에서 에너지가 급히 필요할 때 에너지가 이 반응을 통하여 발생하게 된다²¹⁾. 그러므로 神門 자침이 이 효소의 증가를 유발하였다는 것은 神門 자침이 해마의 신경세포 내에서 에너지를 쉽게 발생시킬 수 있도록 도와주는 기능을 가지고 있는 것으로 사료된다.

SNAP은 세포 안 vesicle이 세포막과 융합할 때 필요한 단백질로, vesicle을 통한 신호전달물질이 분비되어야 할 필요성이 있을 때 발현이 증가한다고 알려져 있다²²⁾. 神門 자침으로 해마 조직에서 이 단백질이 증가되었다는 것은 神門 자극이 신호전달물질의 분비가 활성화되었다 것을 의미한다.

VDAC2는 미토콘드리아 외막에 가장 많이 분포하는 단백질인 VDAC의 한 종류이며, 작은 소수성 분자²³⁾ 뿐만 아니라 Ca^{2+} 를 내부로 운반하는 역할

을 한다²⁴). 神門 자침으로 해마 조직에서 이 단백질이 증가되었다는 것은 神門 자극이 미토콘드리아의 기능을 활성화한다는 것을 의미한다.

GPDH는 지질대사과정에서 DHAP를 glycerol로 전환하는 역할을 가진다. GPDH의 발현이 증가하면 glycerol의 양도 많아질 수 있다. Glycerol은 glycolysis를 경유해 ATP 합성을 위한 쓰일 수 있기 때문에 자침에 유도된 GPDH의 증가는 대사활성에 영향을 준다고 볼 수 있다²⁵).

PAF-AH는 platelet-activating factor(PAF)를 가수분해하여 lyso-PAF를 만들어 PAF를 비활성화하는 효소이다. 뇌의 PAF증가는 허혈성 뇌질환을 유도할 수 있다고 알려져 있기에²⁶), 神門 자침에 의한 PAF-AH의 증가는 PAF에 의한 뇌질환의 유발을 억제하는데 도움을 줄 수 있다고 여겨진다.

기존의 프로테오믹스 기법을 이용하여 자침 후 뇌에서 나타나는 단백질 발현의 변화를 조사한 논문을 살펴보면, 본 연구 결과와 몇 가지 일치하는 부분이 있다. Jeon 등²⁷)이 파킨슨병 동물 모델의 흑질(substantia nigra)에서 陽陵泉(GB34)에 자침하였을 때 NSF 및 EF-Tu가 자침 후 증가된다고 보고한 부분이 본 연구와 일치하였으며, Kim 등²⁸)은 모성 분리 우울증 동물 모델에서 神門 자침 후 시상하부에서 tubulin 및 SNAP 관련 단백질의 변화가 관찰되었다고 보고한 부분이 본 연구 결과와 일치한다. 즉 NSF는 SNAP과 밀접한 관련이 있고, EF-Tu는 tubulin과 밀접한 관계를 가지고 있음을 고려한다면, 침 자극이 tubulin 및 SNAP 단백질과 상당한 관련성이 있을 것으로 판단되며 이에 대해서는 추후 심도있는 연구가 필요하다.

일반적으로 침 치료는 몸 안에 있는 기운의 불균형을 바로 잡아줌으로써 효과를 발휘하는 치료법이기 때문에, 정상 상태의 동물에 자침을 하더라도 이로 인한 변화가 나타나지 않는 경우가 많다. 실제로 Lim 등¹⁰)의 연구를 살펴보면, 정상 백서의 神門에 자침을 하여도 체중, 이동거리, NPY-positive cell의 숫자 등이 비자침군에 비하여 유의

한 차이가 없었으며, 본문에 언급하지는 않았지만 본 연구에서도 체중, 이동거리 및 우울증 관련 평가인 tail suspension test 모두 神門 자침군과 비자침군 사이에 통계적 유의성이 없는 것으로 나타났다. 이 결과는 정상 상태의 동물은 체내의 陰陽이 조화로운 상태이므로 神門을 자침하더라도 陰陽의 변화가 거의 없기에 체중 및 행동 실험에서 변화가 나타나지 않는다는 것을 암시한다.

하지만 프로테오믹스 기법을 이용하여 해마에서 나타나는 단백질의 변화를 분석한 결과, 神門 자침은 해마에서 포도당 및 지질 대사, 단백질 합성, 세포 분화, 신호전달물질 분비, 미토콘드리아의 기능에 중요한 역할을 하는 20개 단백질을 증가시켰으며, 발현이 감소된 단백질은 없었다. 이는 神門 자침으로 인해 해마의 포도당 및 지질 대사, 단백질 합성 등 다양한 기능이 활성화되지만, 이러한 변화는 체중 및 행동의 변화는 야기하지 않음을 의미한다. 다만 Kim 등²⁹)의 연구에서 少府 자침 후 신경독인 kainic acid를 주입하였을 때 해마 신경세포의 파괴가 억제된 연구 결과를 볼 때, 정상 상태에서 나타나는 자침으로 인한 여러 대사의 활성화가 체내의 陰陽을 유지시키는 기능을 강화함으로써 신경독 등 외부 자극으로 인한 해마 신경세포의 변화를 억제하는 것으로 사료된다.

본 연구는 비경혈 또는 타 경혈에 자침하였을 때의 효과를 비교하지 않았기에, 이러한 변화들이 神門에 자침하였기 때문이 아니라 자침 그 자체의 효과 때문에 나타날 가능성 또한 존재한다. 이 부분에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

생후 15일 된 어린 백서의 神門에 7일 간 자침한 후 해마 조직을 적출하여 이차원 전기영동을 이용해 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 神門 자침은 해마 조직에서 tubulin β -4 chain, SNAP, tubulin T β -15, tubulin α -1B chain, eIF4A-2, Hsc, GST ω -1, cytoplasmic GPDH, EF-Tu, eIF4A-3, phosphoglucosyltransferase-1, SSADH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like, PAF-AH IB subunit alpha, transketolase, mitochondrial aconitate hydratase, GST P, GST Yb-3, VDAC2, mitochondrial creatine kinase U-type 등 20개의 단백질 발현을 유의하게 증가시켰다.
2. 神門 자침으로 인해 증가하는 단백질 중 SSADH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like, transketolase, aconitate hydratase, phosphoglucosyltransferase-1 5종의 단백질은 포도당 대사에 관여하는 단백질이고, eIF-4A2, eIF-4A3, EF-Tu, Hsc 4종의 단백질은 리보솜의 단백질 합성에 관여하며, tubulin β -4 chain, tubulin T β -15, tubulin α -1B chain 3종은 세포 분화시 증가하는 세포 골격 형성 단백질이고, GST P, GST Yb-3, GST ω -1은 항산화 효과를 가지고 있으며, SNAP은 신호 전달과 관련 있고, VDAC2는 미토콘드리아 신호 전달과 관련 있으며, GPDH는 지질 대사에 관여하며, PAF-AH는 PAF로 야기되는 뇌질환의 유발을 억제한다. 이를 종합하면 神門 자침은 해마의 포도당 및 지질 대사, 항산화 효과, 세포의 분화 등을 촉진시키는 것으로 판단된다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (No. 2010-0021190).

참고문헌

1. Lee JG, Kim EH, Lee JH. Effect of gentianae radix on neurogenesis and apoptosis in hippocampus of ethanol-induced newborn rats. *J Orient Neuropsychiatr.* 2010 ; 21(2) : 29-44.
2. Hampel H, Bürger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2008 ; 4(1) : 38-48.
3. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. *N Engl J Med.* 2003 ; 349(13) : 1257-66.
4. Joels M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 2008 ; 583(2-3) : 312-21.
5. Yim YK. Details of meridians & acupoints: a guide book for college students. Wonju : Uibang Publishing Co. 2010 : 424.
6. Jeon HJ, Lee BH, Lee KM, Kim JS, Lee YK, Lee JH, et al. A synergy effect of combination of acupoints in cocaine take. *J Korean Acupunct Mox Soc.* 2010 ; 27(2) : 31-41.
7. Chae YB, Lee JC, Park KM, Lee HJ, Kang OS, Kim SY, et al. Inhibitory effect of acupuncture at HT7 on the sympathetic activations to smoking-related visual cues during smoking cessation. *Korean J Acupunct.* 2009 ; 26(4) : 39-52.
8. Jang JY, Cho SY, Kim SJ, Kim YS, Nam SS. The effect of laser acupuncture at HT7(Sinmun) for mental stress on short-term analysis of heart rate variability. *J Korean Acupunct Mox Soc.* 2010 ; 27(5) : 51-8.
9. Park HJ, Lim S, Lee HS, Lee HJ, Yoo YM, Kim SA, et al. Acupuncture enhances cell

- proliferation in dentate gyrus of maternally-separated rats. *Neurosci Lett.* 2002 ; 319(3) : 153-6.
10. Lim S, Ryu YH, Kim ST, Hong MS, Park HJ. Acupuncture increases neuropeptide Y expression in hippocampus of maternally-separated rats. *Neurosci Lett.* 2003 ; 343(1) : 49-52.
 11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 ; 7(72) : 248-54.
 12. Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1980 ; 105(2) : 361-3.
 13. Fernandenz J, Gharahdaghi F, Mische SM. Routine identification of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) gels or polyvinyl difluoride membranes using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Electrophoresis.* 1998 ; 19 : 1036-45.
 14. Turner AJ, Whittle SR. Biochemical dissection of the γ -aminobutyrate synapse. *Biochem J.* 1983 ; 209 : 29-41.
 15. Errington AC, Gibson KM, Crunelli V, Cope DW. Aberrant GABAA receptor-mediated inhibition in cortico-thalamic networks of succinic semialdehyde dehydrogenase deficient mice. *PLoS ONE.* 2011 ; 6(4) : e19021.
 16. Sirover MA. Subcellular dynamics of multi-functional protein regulation: mechanisms of GAPDH intracellular translocation. *J Cell Biochem.* 2012 (Epub ahead of print) ; doi : 10.1002/jcb.24113.
 17. Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N, et al. Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat Genet.* 2009 ; 41(6) : 746-52.
 18. Kim ST, Park HJ, Hong MS, Kim SN, Doo AR, Yin C, et al. Acupuncture stimulation to HT8 enhances cell proliferation in hippocampus on an epilepsy mouse model. *Kor J Acupunct.* 2010 ; 27(2) : 49-56.
 19. Sun KH, Chang KH, Clawson S, Ghosh S, Mirzaei H, Regnier F, et al. Glutathione-S-transferase P1 is a critical regulator of Cdk5 kinase activity. *J Neurochem.* 2011 ; 118(5) : 902-14.
 20. Kim K, Kim SH, Kim J, Kim H, Yim J. Glutathione s-transferase omega 1 activity is sufficient to suppress neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2012 ; 287(9) : 6628-41.
 21. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phospho-creatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 1992 ; 281(1) : 21-40.
 22. Pozzi D, Condliffe S, Bozzi Y, Chikhladze M, Grumelli C, Proux-Gillardeaux V, et al. Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *PNAS.* 2008 ; 105(1) : 323-8.
 23. Godbole A, Mitra R, Dubey AK, Reddy PS, Mathew MK. Bacterial expression, purification and characterization of a rice voltage-dependent, anion-selective channel isoform, OsVDAC4.

- J Membr Biol. 2011 ; 244(2) : 67-80.
24. Subedi KP, Kim JC, Kang M, Son MJ, Kim YS, Woo SH. Voltage-dependent anion channel 2 modulates resting Ca^{2+} sparks, but not action potential-induced Ca^{2+} signaling in cardiac myocytes. *Cell Calcium*. 2011 ; 49(2) : 136-43.
25. Nguyen NHT, Bråthe A, Hassel B. Neuronal uptake and metabolism of glycerol and the neuronal expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J Neurochem*. 2003 ; 85(4) : 831-42.
26. Nishida K, Markey SP. Platelet-activating factor in brain regions after transient ischemia in Gerbils. *Stroke*. 1996 ; 27 : 514-9.
27. Jeon S, Kim YJ, Kim ST, Moon W, Chae Y, Kang M, et al. Proteomic analysis of the neuroprotective mechanism of acupuncture treatment in a Parkinson's disease mouse model. *Proteomics*. 2008 ; 8(22) : 4822-32.
28. Kim HJ, Park HJ, Hong MS, Song JY, Park HY, Jo DJ, et al. Effect by acupuncture on hypothalamic expression of maternally separated rats: proteomic approach. *Neurol Res*. 2010 ; 32(Suppl 1) : S69-73.
29. Kim ST, Jeon S, Park HJ, Hong MS, Jeong WB, Kim JH, et al. Acupuncture inhibits kainic-acid induced hippocampal cell death in mice. *J Physiol Sci*. 2008 ; 58(1) : 31-8.