

Original Article / 원저

네트워크 약리학을 활용한 메니에르병에 대한 二陳湯의 활성 성분과 치료 기전 연구(I)

진선경¹ · 남혜정²

경희대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실¹대학원생, ²교수

Analysis of the Active Compounds and Therapeutic Mechanisms of Yijin-tang on Meniere's Disease Using Network Pharmacology(I)

SunKyung Jin¹ · Hae-Jeong Nam²

Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology of Korean Medicine,
College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Abstract

Objectives : This study used a network pharmacology approach to explore the active compounds and therapeutic mechanisms of Yijin-tang on Meniere's disease.

Methods : The active compounds of Yijin-tang were screened via the TCMSD database and their target proteins were screened via the STITCH database. The GeneCard was used to establish the Meniere's disease-related genes. The intersection targets were obtained through Venny 2.1.0. The related protein interaction network was constructed with the STRING database, and topology analysis was performed through CytoNCA. GO biological function analysis and KEGG enrichment analysis for core targets were performed through the ClueGO.

Results : Network analysis identified 126 compounds in five herbal medicines of Yijin-tang. Among them, 15 compounds(naringenin, beta-sitosterol, stigmaterol, baicalein, baicalin, calycosin, dihydrocapsaicin, formononetin, glabridin, isorhamnetin, kaempferol, mairin, quercetin, sitosterol, nobiletin) were the key chemicals. The target proteins were 119, and 7 proteins(TNF, CASP9, PARP1, CCL2, CFTR, NOS2, NOS1) were linked to Meniere's disease-related genes. Core genes in this network were TNF, CASP9, and NOS2. GO/KEGG pathway analysis results indicate that these targets are primarily involved in regulating biological processes, such as excitotoxicity, oxidative stress, and apoptosis.

Conclusion : Pharmacological network analysis can help to explain the applicability of Yijin-tang on Meniere's disease.

Key words : Yijin-tang; Meniere's disease; Network Pharmacology

I. 서론

메니에르병(Meniere's disease)은 발작성 현훈, 감각 신경성 난청, 이명, 이충만감이 반복되는 만성 내이 장애이다. 1861년 프랑스 의사인 Prosper Meniere에 의해 보고되었다¹⁾. 메니에르병은 대표 증상 외에도 사회 참여나 신체 활동을 제한하고, 피로를 증가시키며, 업무 능력을 감소시켜 삶의 질에 큰 영향을 미치고 불안과 기타 심리적 장애를 유발할 수 있다. 난청성 메니에르병을 가진 개인 중 40-60%가 신경증 또는 우울증을 경험한다²⁾.

메니에르병의 병태 생리나 발병 원인은 명확하게 밝혀지지 않았으나, 내림프액(endolymph)의 비정상적인 생성과 흡수로 인한 병리 현상으로 간주되고 있다. 내림프의 압력이 증가하면서 내림프막이 파열되고, 그로 인해 내림프액이 유출되고 압력이 감소하면서 파열부가 복구되는 과정에서 내이 기능의 장애로 인한 증상이 나타난다. 증상의 소실과 발작이 반복되는 과정에서 내이 기능이 점차 떨어지게 되며 청력 소실을 유발하기도 한다³⁾. 메니에르병의 원인은 해부학적 요인, 바이러스 감염, 자가면역 질환, 알레르기, 외상 등으로 추정된다⁴⁾.

二陳湯은 《太平惠民和劑局方》에 최초로 기록되어 《東醫寶鑑》 등에 이르기까지 여러 시대를 거쳐 임상에 활용된 처방이다⁵⁾. 半夏(*Pinellia ternate*), 陳皮(*Citrus unshiu*), 赤茯苓(*Poria cocos*), 炙甘草(*Glycyrrhiza uralensis*), 生薑(*Zingiber officinale*)으로 구성되어 있으며, 痰飲을 치료하는데 가장 기본이 되는 처방이다.

痰飲은 체내의 과다한 수분이 일부에 정취된 것으로 비생리적인 분비물을 의미하는데⁶⁾, 메니에르병에서 나타나는 내림프 수종은 한의학에서 津液 대사의 병리적 산물인 水濕, 痰飲으로 이해된다⁷⁾.

본 연구에서 활용하는 네트워크 약리학(Network

Pharmacology)은 생물 정보학, 시스템 생물학을 기반으로 질병, 유전자 표적, 약물 간의 네트워크를 통해 약물의 작용 기전과 상호작용 효과를 분석하는 방식이다. 네트워크 약리학은 one drug, one target 약물 접근 방식에서 multicomponent therapeutics, network target을 고려한 약물 접근 방식으로 변화를 강조한다⁸⁾. 약물의 작용 기전을 상호 연결된 생물학적 네트워크상으로 접근하는 방식은 복합 성분으로 구성되어 다중 표적에 작용하는 한약을 탐색하기에 적합한 방식으로 보인다⁹⁾.

본 연구는 복잡한 병태 생리를 특징으로 하는 메니에르병에 二陳湯을 구성하는 약재들이 어떤 활성 성분과 타겟 단백질들을 가지고 있으며, 어떤 치료 기전을 가지는지, 그리고 기존 메니에르병 치료에 사용되는 약물 치료 기전과의 비교 분석을 네트워크 약리학을 활용하여 알아보고자 한다. 이를 위해서 첫째로, 二陳湯을 구성하는 약재의 네트워크 약리학을 이용한 분석이 필요하고, 둘째로, 현재 메니에르병 치료에 사용되는 약물과 二陳湯의 구성 약재 사이의 상호관계를 확인할 필요가 있다. 이번 연구에서는 첫 번째 부분인 二陳湯을 구성하는 약재의 네트워크 약리학을 이용한 분석에 대해 보고하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 二陳湯의 활성 성분 수집

二陳湯의 활성 성분을 수집하기 위하여 The traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform(TCMSP)을 활용하였다. 二陳湯의 처방 구성인 半夏, 陳皮, 茯苓, 甘草, 生薑 각각을 중국어 간자체를 입력하여 검색을 시행하였고, 검색 결과에서 human oral bioavailability(OB)≥ 30%, drug-likeness(DL)≥0.18의 기준을 충족하는 성분을 활성 성분으로 선별하였다.

2. 二陳湯의 활성 성분의 타겟 단백질 수집

앞서 수집한 二陳湯의 활성 성분이 타겟으로 하는 단

Corresponding author : Hae-Jeong Nam, Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology and Dermatology of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Republic of Korea.
(Tel : 02-958-9244, E-mail : ophthrl@khu.ac.kr)

•Received 2023/1/7 •Revised 2023/1/31 •Accepted 2023/2/7

백질을 수집하기 위하여 search tool for interactions of chemicals ver.5.0(STITCH)을 활용하였다. 활성 성분의 이름으로 검색을 시행하였고, organism은 Homo sapiens로 지정하였다. 검색 결과에서 interaction score가 high confidence(0.700) 이상의 기준을 충족하는 단백질을 선별하였다.

또한, 二陳湯의 구성 본초와 수집한 활성 성분, 그리고 타겟 단백질 사이의 연관성과 위상을 평가하기 위하여 Cytoscape ver.3.9.1을 활용하여 네트워크를 시각화하였다.

3. 메니에르병 연관 단백질 수집

메니에르병과 연관된 단백질 정보를 수집하기 위하여 GeneCards를 활용하였다. “meniere disease”, “meniere’s disease”, “meniere syndrome”, “meniere’s syndrome”, “meniere”로 검색을 시행하였다.

4. 교차 타겟 단백질 확인

앞서 수집한 타겟 단백질을 대상으로 venny 2.1.0을 사용하여 벤 다이어그램 그래프를 작성하였다. 二陳湯의 타겟 단백질과 메니에르병 연관 단백질 간의 교차 내용을 시각화하여 확인하였다. 각 군의 결과는 통합하여 중복을 제거한 값이다.

5. Protein-Protein Interaction(PPI) 및 Core Genes 분석

二陳湯과 메니에르병에서 공통되는 타겟 단백질의 상호작용을 확인하기 위하여 STRING ver.11.5를 활용하여 PPI 분석을 시행하였다. organism은 Homo sapiens로 지정하였다. 검색 결과에서 interaction score가 high confidence(0.700) 이상의 기준을 충족하는 단백질을 선별하였다.

또한 각각의 PPI network에서 핵심적으로 작용하는 타겟 단백질들, 즉, Core Genes를 확인하기 위하여

Cytoscape ver.3.9.1에서 CytoNCA ver.2.1.6을 활용하였다. Betweenness Centrality(BC), Closeness Centrality(CC), Degree Centrality(DC), Eigenvector Centrality(EC) 4가지 지표의 평균값을 구하고 평균값 이상을 갖는 단백질을 Core Genes로 추출하였다.

6. Gene Ontology(GO) 및 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway 분석

앞서 수집한 타겟 단백질에 대하여 GO 분석과 KEGG pathway 분석을 위하여 Cytoscape ver.3.9.1에서 ClueGO ver.2.5.9를 활용하였다. 메니에르병에 대한 二陳湯의 작용점을 확인하기 위하여 메니에르병과 二陳湯 공통 타겟 단백질을 대상으로 분석을 수행하였다.

III. 결 과

1. 二陳湯의 활성 성분 및 타겟 단백질

TCMSP 검색 결과에서 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 의 기준을 충족하는 성분을 활성 성분으로 선별하였고, 결과를 통합하고 중복을 제거하여 총 126개의 활성 성분을 수집하였다.

STITCH에서 각각의 선별된 활성 성분이 타겟으로 하는 단백질을 검색하였고, 검색 결과에서 interaction score가 high confidence(0.700) 이상의 기준을 충족하는 단백질을 선별하였다. 결과를 통합하고 중복을 제거하여 총 119개의 단백질을 수집하였다(Fig. 1, Appendix 1).

Cytoscape에서 5개의 본초와 활성 성분, 타겟 단백질 간의 네트워크를 시각화하였다(Fig. 2). 총 162개의 노드, 235개의 엣지로 구성되었으며, 주황색 노드는 5개의 본초, 하늘색 노드는 본초의 활성 성분, 초록색 노드는 타겟 단백질이다. 각 본초와 활성 성분, 타겟 단백질의 연관성은 엣지로 연결되어 있다. 해당하는 타겟 단백질이 없는 활성 성분은 네트워크에서 삭제되었다. 네

트위크상 23개의 활성 성분의 degree 평균값은 6.18이었으며 최고값은 22였다. 평균 이상의 degree를 가진 활성 성분은 총 15개로 naringenin, beta-sitosterol, Stigmasterol, baicalein, Baicalin, Calycosin, Dihydrocapsaicin, formononetin, Glabridin, isorhamnetin, kaempferol, Mairin, quercetin, sitosterol, nobiletin이 추출되었다. 119개의 타겟 단백질의 degree 평균값은 1.63이었으며 최고값은 9였다. 평균 이상의 degree를 가진 타겟 단백질은 총 45개가 추출되었다(Appendix 2).

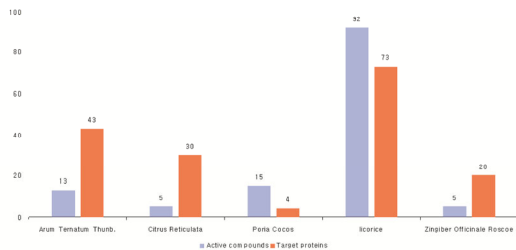


Fig. 1. The Number of Active Compounds and Target Proteins of *Arum Ternatum Thunb.*, *Citrus Reticulata*, *Poria Cocos*, *licorice*, *Zingiber Officinale Roscoe*

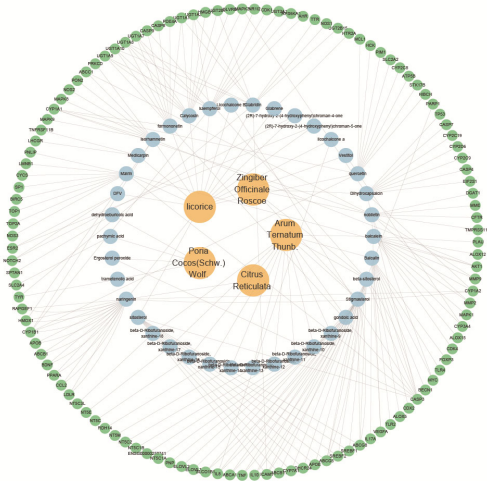


Fig. 2. The Network of Herbs-Compounds-Target Proteins Interactions by Cytoscape

2. 메니에르병 연관 단백질

Genecards에서 메니에르병 연관 단백질을 수집하기 위해 검색한 모든 결과를 통합하고 중복을 제거하여 총 121개의 유전자가 검색되었다(Appendix 3).

3. 단백질 표적 간 교차 분석

앞서 수집한 二陳湯의 타겟 단백질, 메니에르병 연관 유전자를 대상으로 벤 다이어그램을 작성하여 각 군집 사이의 교차 대상을 확인하였다(Fig. 3).

二陳湯과 메니에르병에 모두 연관이 있는 단백질은 총 7개로 TNF, CASP9, PARP1, CCL2, CFTR, NOS2, NOS1이었다.

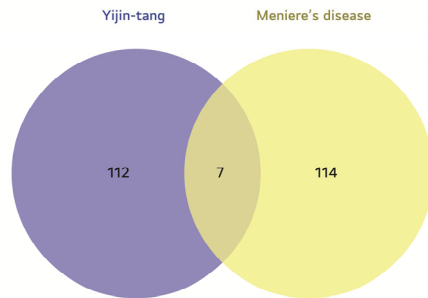


Fig. 3. Venn Diagram Showing Intersection Targets between Yijin-tang Compounds Target Proteins and Meniere's Disease Related Genes by Venny

4. Protein-Protein Interaction(PPI) network 분석 및 Core Genes 추출

STRING에서 二陳湯과 메니에르병에 모두 연관이 있는 7개의 단백질을 바탕으로 PPI network를 분석하였다. PPI network는 6개의 노드, 5개의 엣지로 구성되어 6개의 타겟이 network에서 상호작용 할 수 있으며, 5개의 상호작용을 가지는 것을 확인하였다. 각각 TNF가 3개, CASP9, NOS2가 2개, PARP1, CCL2, NOS1이 1개의 엣지를 가지며 엣지의 두께는 confidence score에 비례한다(Fig. 4).

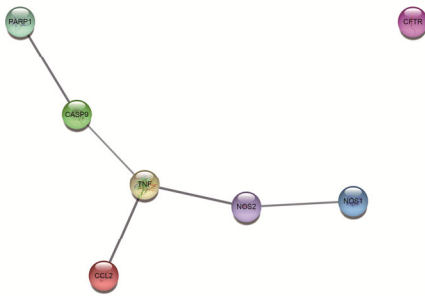


Fig. 4. Protein-Protein Interaction Networks of 7 Intersection Targets between Yijin-tang Compounds Target Proteins and Meniere's Disease Related Genes by STRING

CytoNCA에서 위상학적(topology) 분석으로 위 PPI network의 core genes를 분석하였다. 기준이 되는 4 가지 지표에서 평균값은 각각 BC 4.571428571, CC 0.322108846, DC 1.428571429, EC 0.328684919 였다. 모든 지표에서 평균값 이상을 갖는 단백질은 총 3 개로 TNF, CASP9, NOS2였으며 이를 core genes로 간주하였다(Table 1).

5. Gene Ontology(GO) 및

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway 분석

ClueGO에서 타겟 단백질에 대한 GO 분석과 KEGG pathway 분석을 하였다. 메니에르병 연관 단백질과 二

陳湯 활성 성분의 타겟 단백질 간 총 7개의 공통 타겟 단백질을 대상으로 분석하였을 때 p value<0.05 조건에서 GO database에서 20개의 Biological Process Term, 1개의 Molecular Function Term이 도출되었으며, KEGG database에서 1개의 pathway가 도출되었다. 총 22개의 pathway에서 4개의 기능적 그룹을 형성하였으며 regulation of purine nucleotide biosynthetic process(81.82%), neuron death in response to oxidative stress(9.09%), regulation of anion transmembrane transport(4.55%), cysteine-type endopeptidase activity involved in execution phase of apoptosis(4.55%)로 나타났다(Fig. 5).

IV. 고 찰

메니에르병은 병태 생리나 발병 원인이 명확하게 밝혀진 것 없이 다양하고 불확실하며, 이에 따라 병인에 따른 치료가 힘들고 효과적인 치료로 확립된 바가 없다. 이러한 특성에 따라 multi-compound, multi-target, multi-pathway 특성을 갖는 한의학이 좋은 접근이 될 수 있을 것으로 보인다.

메니에르병의 증상은 한의학의 痰飲과 매우 유사하고 이에 痰飲의 기본 처방인 二陳湯에 대한 연구가 기존에 있을 것이라고 예상하였으나 기존 二陳湯을 주제로 한 네트워크 약리학 연구¹⁰⁻²⁾ 중 메니에르병은 없었다.

Table 1. Core Genes by CytoNCA. Orange Cells are over the Average Value and Purple Cells are the Core Genes.

Genes	Betweenness	Closeness	Degree	Eigenvector
TNF	16	0.42857143	3	0.6279638
CASP9	8	0.375	2	0.44405144
NOS2	8	0.375	2	0.44402128
CCL2	0	0.33333334	1	0.32505906
PARP1	0	0.3	1	0.2298551
NOS1	0	0.3	1	0.22984375
CFTR	0	0.14285715	0	0
Average	4.571428571	0.322108846	1.428571429	0.328684919

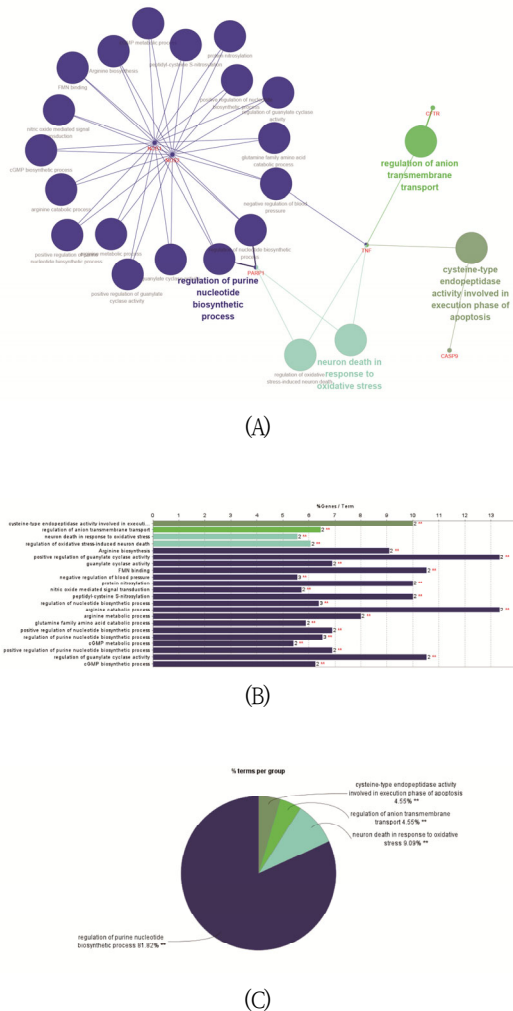


Fig. 5. (A) Network of 7 Intersection Targets Proteins between Yijin-tang Compounds Target Proteins and Meniere's Disease Related Genes and Related Pathways by ClueGo (B) Percent of Genes Per Term (C) Percent of Terms per Group

일차로 二陳湯 각 본초의 활성 성분을 확인하고 각각의 타겟 단백질을 추출하여 네트워크를 시각화하였을 때 네트워크에서 주요한 작용을 가지는 것으로 예상되는 활성 성분은 naringenin, beta-sitosterol, stigmasterol, baicalein, baicalin, calycosin, dihydrocapsaicin, formononetin, glabridin, isorhamnetin, kaempferol,

mairin, quercetin, sitosterol, nobiletin이 있었다.

이러한 二陳湯의 유효 성분들은 다양한 치료 효과를 나타내는 중, 공통적으로 항산화 효과, 항염증 효과를 가지고 있으며, 신경 보호 작용을 가지고 있는 것으로 확인되며 이러한 부분이 메니에르병을 치료함에 영향을 미칠 것으로 추론된다.

두 번째로, 메니에르병 연관 유전자를 추출하여, 二陳湯의 타겟 단백질과의 교차 대상을 분석하였을 때 TNF, CASP9, NOS2가 핵심적인 표적으로 나타났다.

Tumor Necrosis Factor(TNF)는 면역 작용을 하는 세포가 조직으로 침투하도록 유도하고 면역 반응을 증폭시키는 역할을 한다¹³⁾. TNF- α 와 같은 cytokines가 메니에르병 환자에서 건강한 대조군과 비교하여 더 높은 수치로 나타나며¹⁴⁾, TNF- α 유전자의 프로모터에서 위치 -238에 있는 대립 유전자 A/G의 빈도가 메니에르병 환자와 건강한 대조군 간에 유의한 차이를 보여 TNF- α 와 메니에르병에 대한 연관성을 보여준다¹⁵⁾. 동물 모델에서 달팽이관 기관의 감각 세포로 백혈구 침투가 TNF- α 에 의해 유도될 수 있음을 확인하였다¹⁶⁾.

Caspase 9(CASP9)는 cytokines 처리와 apoptosis에 관여하는 cysteine protease caspase 계열 중 하나이다. 메니에르병으로 인한 난치성 어지럼증 치료를 위해 고실 내 gentamicin 주사를 시행할 때 CASP9 유전자형이 감수성을 나타내었다¹⁷⁾. CASP9는 gentamicin에 의해 손상된 감각 유모 세포에서 활성화된다¹⁸⁾. CASP9는 내이 독소로 손상된 내이 유모 세포의 세포 사멸에 필수적인 구성 요소로 밝혀졌다¹⁹⁾.

Nitric Oxide Synthase 2(NOS2)는 유도 후 분해될 때까지 지속적으로 NO를 생성하는 효소이다²⁰⁾. 생리학적 농도에서 NO는 달팽이관과 전정계의 신경전달뿐만 아니라 달팽이관 혈류 조절, 청각 전달에 관여하며²¹⁾, 비정상적인 iNOS 유도는 인간 질병의 병태생리에 관여하고 이독성을 유발할 수 있다²²⁾. 수성 달팽이관에서 iNOS 발현이 확인되었고²³⁾, 달팽이관 NO 매개 독성이 나선 신경절 세포에서 세포 사멸 유도와 관련이 있음을 확인하였다²⁴⁾. 또한 메니에르병 환자의 내이에서는 내림

프와 외림프의 이온 수송과 내이의 체액 균형 유지에 중요한 역할을 하는 혈액 미로 장벽(blood labyrinthine barrier, BLB)의 손실을 관찰할 수 있는데²⁵⁾, BLB의 혈관 내피 세포와 난형낭, 평행반에서 iNOS 발현 수준이 증가한 것을 확인하였다²⁶⁾.

따라서 TNF는 과민성 염증 반응을 유도하고, CASP9는 세포 사멸 경로를 유도하고 NOS2는 산화 스트레스에서 세포 사멸 유도과 내이의 체액 균형 유지에 관여하여 메니에르병 치료에 잠재적 표적이 될 수 있다.

하지만 TNF- α 수치가 메니에르병 환자와 건강한 사람 사이에 유의미한 차이를 확인할 수 없었거나²⁷⁾, NOS1과 NOS2A의 기능 변이와 메니에르병의 진행성 난청과의 유의한 연관성을 찾을 수 없었다는 연구²⁸⁾ 등 앞서 소개한 연구들과 상반되는 결과를 가진 연구도 존재하여 각 유전자의 작용이 메니에르병에 어떤 영향을 끼치는지는 추가적인 연구가 필요하다.

세 번째로, GO term과 KEGG pathway 분석을 시행하였다. 메니에르병과 二陳湯의 공통 단백질군에서 총 4개의 경로가 그룹화되었다. regulation of purine nucleotide biosynthetic process, neuron death in response to oxidative stress, regulation of anion transmembrane transport, cysteine-type endopeptidase activity involved in execution phase of a poptosis가 네트워크에서 중요한 경로일 수 있음을 나타냈다.

regulation of purine nucleotide biosynthetic process에 연관된 유전자는 NOS1, NOS2, PARP1, TNF이고, neuron death in response to oxidative stress에 연관된 유전자는 PARP1, TNF이고, cysteine-type endopeptidase activity involved in execution phase of apoptosis에 연관된 유전자는 CASP9, TNF로 각각 흥분 독성, 산화 스트레스, 세포 사멸 기전과 상응한다. 흥분 독성과 산화 스트레스를 통해 세포 사멸이 일어나고 신경 손상이 발생할 수 있다. 메니에르병의 청력 상실은 부분적으로 나선 신경절 뉴런의 세포 사멸에 의해 설명될 수 있으며²⁹⁾ 내림프 수종에

대한 연구에서 NOS2, 산화 스트레스, CASP3의 활성화가 증가하여 세포 사멸을 초래하는 것으로 나타났다³⁰⁾.

더불어 면역 이상이 일부 특발성 청력 상실과 전정 장애에 영향을 줄 수 있다. 만성적인 염증 반응은 적응 면역에 영향을 주며 양성 피드백 반응을 나타낸다. 이로 인해 내이 조직이 손상되며 특히 내림프낭, 달팽이관의 혈관신조(stria vascularis)와 세망섬유(reticular fiber)가 가장 높은 손상 잠재력을 가지고 있다³¹⁾. PARP1은 전염증성 NF- κ B 전사 인자를 상향 조절함으로써 염증 반응을 촉진하며, 산화 스트레스, LPS, cytokines 또한 NF- κ B를 활성화한다³²⁾.

regulation of anion transmembrane transport에 연관된 유전자는 CFTR, TNF로 내림프액 항상성 이상 기전과 상응한다. 내이 상피세포에서 이온 채널의 이상, 내림프액에서의 Na⁺ 흡수 저하가 내림프 수종을 일으키는 원인이 될 수 있다³³⁾. 내이에서 Na⁺ 흡수를 조절하는 주요 물질은 부신피질호르몬과 ATP로 알려져 있으며, 내이의 면역 반응 시에 증가하는 염증성 cytokines인 IFN- γ 와 IL-1 β 가 Na⁺의 흡수를 저하한다는 연구 결과가 있다^{34,35)}. CFTR의 기능장애는 내림프의 이온 수송 장애를 유발할 수 있으며, 나아가 내림프 수종을 유발할 수 있다³⁶⁾.

다만 본 연구에서 시행한 네트워크 약리학을 활용한 분석은 二陳湯의 실제 작용 기전을 설명해내기엔 부족한 부분이 많다. 첫 번째로 네트워크 약리학은 한약 처방 구성 원리인 군신좌사와는 별개로 활성 성분을 많이 가진 약재에 영향을 받을 수밖에 없다. 즉, 어떤 약재가 연구가 많이 수행되었고, 어떤 약재가 활성 성분과 작용 기전 데이터가 많이 쌓였느냐에 따라 결과가 달라질 수 있다. 본 연구에서도 二陳湯의 5가지 약재 중 군약인 半夏보다는 가장 많이 연구가 이루어진 甘草에서 가장 많은 활성 성분이 스크리닝 되었고 각 성분이 타겟으로 하는 단백질도 甘草에서 가장 많았다. 본 연구에서 추출한 二陳湯과 메니에르병의 공통 타겟 단백질과 core genes는 甘草에만 한정되지 않았으나, 실제로 대부분의 한약 처방 약재에는 甘草가 구성되어 있어 앞으로 네트워크 약리학

을 활용하여 한약 연구를 할 때 이 부분을 어떻게 처리할 것인지에 대한 고찰이 필요하다. 그리고 기존의 정보를 바탕으로 분석을 시행하기 때문에 다양한 약재에 대한 정확한 기초 연구의 선행이 필수적이다.

두 번째로 데이터베이스를 통해 추출한 한약재의 활성 성분이 실제 임상에서 전탕하여 추출하는 성분과는 다를 수 있어 실제 추출된 성분으로 약리학적 분석을 수행하였을 때 다른 결과가 도출될 수 있다. 또한, 단일 약재에서 추출되는 활성 성분과 전탕 시 혼합된 약재에서 추출되는 활성 성분이 동일하지 않을 가능성이 존재할 수 있다. 따라서 네트워크 약리학으로 결과를 도출하고, 그 결과를 기반으로 기초 실험에서부터 임상 연구까지 적용하여 해석과 검증이 함께 이루어질 필요가 있다.

본 연구는 이와 같은 제한점을 가지지만 네트워크 약리학 분석을 통해 二陳湯에 구성된 약재의 활성 성분을 파악하고, 二陳湯의 작용 기전을 개략적으로 분석하고, 二陳湯에 있는 다양하고 복합적인 성분이 어떤 단백질을 타겟으로 하여 메니에르병에 어떻게 작용하는지 예측하는 데 의의가 있다. 차후 연구에서는 약물 치료 기전의 비교 분석을 위하여 두 번째 목표인 현재 메니에르병 치료에 사용되는 약물과 二陳湯을 구성하는 약재 사이의 상호관계에 대해 발표하고자 한다.

V. 결 론

본 연구는 네트워크 약리학 방법론을 활용하여 메니에르병에 대한 二陳湯의 작용 기전을 확인하기 위하여 활성 성분과 타겟 단백질 간의 네트워크 분석을 실시하였다. 그 결과, 二陳湯의 5가지 한약재에서 총 126개의 활성 성분을 확인하였으며, 주요 활성 성분은 총 15개로 naringenin, beta-sitosterol, stigmasterol, baicalin, baicalin, calycosin, dihydrocapsaicin, formononetin, glabridin, isorhamnetin, kaempferol, mairin, quercetin, sitosterol, nobiletin이었다. 타겟 단백질은 총 119개였으며, 메니에르병 연관 유전자와 공통되는 유전자는 총 7개로 TNF, CASP9, PARP1, C

CL2, CFTR, NOS2, NOS1이었다. 그중 core genes 는 TNF, CASP9, NOS2였다. 다음으로 수집한 단백질을 GO/KEGG pathway 분석을 수행한 결과, 메니에르병에 대한 二陳湯의 작용 기전은 면역, 내림프액 항상성, 흥분 독성, 산화 스트레스, 세포 사멸 등의 경로와 연관성이 있었다. 즉, 네트워크 약리학 분석을 통하여 二陳湯의 메니에르병에 대한 활성과 작용 기전을 예측할 수 있었고, 본 결과를 토대로 二陳湯의 메니에르병에 응용 가능성을 확인할 수 있었다. 단, 본 연구의 결과에 대한 해석과 검증이 이루어지기 위해서는 기초 실험에서부터 임상 연구까지 향후 추가적인 연구가 함께 필요할 것으로 보인다.

ORCID

SunKyung Jin
(<https://orcid.org/0000-0001-9398-5993>)

Hae-Jeong Nam
(<https://orcid.org/0000-0002-9974-0863>)

References

1. Espinosa-Sanchez JM, Lopez-Escamez JA. Ménière's disease. Handbook of clinical neurology. 2016;137:257-77.
2. Yokota Y, Kitahara T, Sakagami M, Ito T, Kimura T, Okayasu T, et al. Surgical results and psychological status in patients with intractable Ménière's disease. Auris Nasus Larynx. 2016;43(3):287-91.
3. Baloh RW. Harold Schuknecht and pathology of the ear. Otolology & neurotology. 2001; 22(1):113-22.
4. Kiang NYS. An auditory physiologist's view of Meniere's syndrome. 2nd Int Symp Men Dis. Amsterdam:Kugler. 1989:13-24.

5. Jung SC, Kim YJ. The bibliographical study on Yijin-tang(sang). *Journal of Haehwa Medicine*. 2002;11(1):29-41.
6. Park WH, Choi DY. The bibliographical study on Dam-Eum. *The Journal of Dong Guk Oriental Medicine*. 1992;1(1):141-60.
7. Jung HJ, Ko WS, Yoon HJ. Korean Medicinal Review of the Latest Research Trend on Pathology of Meniere's Disease. *J Korean Med Ophthamol Otolaryngol Dermatol*. 2017;30(3):103-18.
8. Li S, Fan TP, Jia W, Lu A, Zhang W. Network pharmacology in traditional Chinese medicine. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2014;2014:2.
9. Lee WY, Lee CY, Kim YS, Kim CE. The methodological trends of traditional herbal medicine employing network pharmacology. *Biomolecules*. 2019;9(8):362.
10. Lee AY, Park W, Kang TW, Cha MH, Chun JM. Network pharmacology-based prediction of active compounds and molecular targets in Yijin-Tang acting on hyperlipidaemia and atherosclerosis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2018;221:151-9.
11. Liu H, Xu J, Li H, Zhang L, Xu P. Network pharmacology-based investigation to explore the effect and mechanism of Erchen decoction against the nonalcoholic fatty liver disease. *The Anatomical Record*. 2021; 304(11):2605-19.
12. Ding S, Chen Q, Huang Y, Li X, Chai Y, Li C, et al. Exploring miRNA-related molecular targets of erchen decoction against lipid metabolism disorder using A network pharmacologic approach. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2022;25(6):986-97.
13. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2008;214(2):149-60.
14. Frejo L, Gallego-Martinez A, Requena T, Martin-Sanz E, Amor-Dorado JC, Soto-Varela A, et al. Proinflammatory cytokines and response to molds in mononuclear cells of patients with Meniere disease. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
15. Patel JA, Nair S, Revai K, Grady J, Saeed K, Matalon R, et al. Association of proinflammatory cytokine gene polymorphisms with susceptibility to otitis media. *Pediatrics*. 2006;118(6):2273-9.
16. Keithley EM, Wang X, Barkdull GC. Tumor necrosis factor α can induce recruitment of inflammatory cells to the cochlea. *Otology & Neurotology*. 2008;29(6):854-9.
17. Huang CJ, Wan TK, Fang TY, Wang PC. CASP9 genotype confers gentamicin susceptibility in intratympanic treatment of intractable vertigo caused by Ménière's disease. *Acta Oto-Laryngologica*. 2019;139 (4):336-9.
18. Junet P, Karkas A, Dumas G, Quesada JL, Schmerber S. Vestibular results after intratympanic gentamicin therapy in disabling Ménière's disease. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2016;273(10):3011-8.
19. Cunningham LL, Cheng AG, Rubel EW. Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *Journal of*

- Neuroscience. 2002;22(19):8532-40.
20. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annual review of immunology. 1997;15:323.
 21. Hess A, Bloch W, Huverstuhl J, Su J, Stennert E, Addicks K, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanical endotoxin-treatment. Brain research. 1999;830(1):113-22.
 22. Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase(iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. Seminars in cancer biology. 2005;15(4):277-89.
 23. Michel O, Hess A, Su J, Bloch W, Stennert E, Addicks K. Expression of inducible nitric oxide synthase(iNOS/NOS II) in the hydroptic cochlea of guinea pigs. Hearing research. 2000;143(1,2):23-8.
 24. Msiv NP, Zdanski CJ, Gregory CW, Prazma J, Carrasco V. Sodium nitroprusside/nitric oxide causes apoptosis in spiral ganglion cells. Otolaryngology—Head and Neck Surgery. 1998;119(4):323-30.
 25. Ishiyama G, Lopez IA, Ishiyama P, Vinters HV, Ishiyama A. The blood labyrinthine barrier in the human normal and Meniere's disease macula utricule. Scientific reports. 2017;7(1):1-10.
 26. Ishiyama G, Wester J, Lopez IA, Beltran-Parrazal L, Ishiyama A. Oxidative stress in the blood labyrinthine barrier in the macula utricule of Meniere's disease patients. Frontiers in Physiology. 2018;9:1068.
 27. Süslü N, Yilmaz T, Gürsel B. Utility of immunologic parameters in the evaluation of Meniere's disease. Acta oto-laryngologica. 2009;129(11):1160-5.
 28. Gazquez I, Lopez-Escamez JA, Moreno A, Campbell CA, Meyer NC, Carey J, et al. Functional variants in NOS1 and NOS2A are not associated with progressive hearing loss in Ménière's disease in a European Caucasian population. DNA and cell biology. 2011;30(9):699-708.
 29. Merchant SN, Adams JC, Nadol Jr JB. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops?. Otology & Neurotology. 2005; 26(1):74-81.
 30. Semaan MT, Alagramam KN, Megerian CA. The basic science of Meniere's disease and endolymphatic hydrops. Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery. 2005;13(5):301-7.
 31. Frejo L, Lopez-Escamez JA. Cytokines and inflammation in Meniere disease. Clinical and Experimental Otorhinolaryngology. 2022;15(1):49.
 32. Pazzaglia S, Pioli C. Multifaceted role of PARP-1 in DNA repair and inflammation: pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases. Cells. 2019;9(1):41.
 33. Morgenstern C, Mori N, Amano H. Pathogenesis of experimental endolymphatic hydrops. Acta Oto-Laryngologica. 1983;96 (406):56-8.
 34. Pawankar R, Tomiyama S, Ikezono T, Nonaka M, Jinnouchi K, Yagi T. Interferon-gamma expression in the inner ear of rats following secondary immune

- reaction in the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2004;553:6-12.
35. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic sac during inner ear inflammation. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology.* 2003;4(2):139-47.
36. Matsubara A, Miyashita T, Inamoto R, Hoshikawa H, Mori N. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the endolymphatic sac of the rat. *Auris Nasus Larynx.* 2014;41(5):409-12.

Appendix 1. The Target Proteins of Yijin-tang

No.	Target Name	No.	Target Name	No.	Target Name
1	ABCA1	41	EIF2S1	81	PDE4A
2	ABCB1	42	ELOVL2	82	PIM1
3	ABCB11	43	ELOVL3	83	PLAU
4	ABCC1	44	ENSG00000250741	84	PNLIP
5	ABCG5	45	ESR2	85	PNP
6	ABCG8	46	FOXP3	86	PON2
7	AHR	47	HCK	87	PPARA
8	AKT1	48	HIBCH	88	PRKCD
9	ALOX12	49	HMGB1	89	RAPGEF1
10	ALOX15	50	HMOX1	90	RDH14
11	ALOX5	51	HTR2A	91	RPS6KA3
12	APOB	52	ICAM1	92	SLC2A2
13	APOE	53	IL10	93	SLC2A4
14	ATP5B	54	IL17A	94	SLCO1B1
15	BDNF	55	IL8	95	SP1
16	BECN1	56	LDLR	96	SPTAN1
17	BIRC5	57	LHCGR	97	SREBF1
18	BLVRB	58	LMNB1	98	SREBF2
19	CASP3	59	MAPK1	99	STK17B
20	CASP4	60	MAPK3	100	TLR2
21	CASP7	61	MAPK8	101	TLR4
22	CASP8	62	MAPK9	102	TMPRSS11D
23	CASP9	63	MCL1	103	TNF
24	CCL2	64	MME	104	TNFRSF11B
25	CDK1	65	MMP2	105	TOP1
26	CDK4	66	MMP9	106	TOP2A
27	CDX2	67	MYC	107	TP53
28	CFTR	68	NOS1	108	TTR
29	CYCS	69	NOS2	109	TYR
30	CYP1A1	70	NOS3	110	UGT1A1
31	CYP1A2	71	NOTCH2	111	UGT1A10
32	CYP1B1	72	NR1I2	112	UGT1A3
33	CYP2C19	73	NT5C	113	UGT1A7
34	CYP2C8	74	NT5C1A	114	UGT1A8
35	CYP2C9	75	NT5C1B	115	UGT1A9
36	CYP2D6	76	NT5C2	116	UGT2B15
37	CYP3A4	77	NT5C3L	117	UGT2B7
38	CYP7A1	78	NT5E	118	UGT3A1
39	DGAT1	79	NT5M	119	VEGFA
40	DHCR24	80	PARP1		

Appendix 2. The Information of Compounds and Target Protein Ranking by Degree

No.	Compounds	Degree	No.	Target proteins	Degree
1	naringenin	22	1	CASP3	9
2	beta-sitosterol	16	2	CYP1B1	5
3	Stigmasterol	16	3	CYP1A2	4
4	baicalein	11	4	ABCG5	4
5	baicalin	11	5	ABCG8	4
6	calycosin	11	6	ICAM1	4
7	dihydrocapsaicin	11	7	UGT1A8	4
8	formononetin	11	8	CYP1A1	4
9	glabridin	11	9	AKT1	3
10	isorhamnetin	11	10	UGT1A1	3
11	kaempferol	11	11	UGT1A10	3
12	mairin	11	12	UGT1A3	3
13	quercetin	11	13	UGT1A7	3
14	sitosterol	11	14	UGT1A9	3
15	nobiletin	11	15	HMOX1	3
			16	IL8	3
			17	NOTCH2	2
			18	ESR2	2
			19	CYP3A4	2
			20	MMP2	2
			21	MMP9	2
			22	MYC	2
			23	VEGFA	2
			24	ABCB11	2
			25	APOE	2
			26	CASP9	2
			27	CYP7A1	2
			28	DHCR24	2
			29	SREBF1	2
			30	SREBF2	2
			31	MAPK3	2
			32	UGT2B7	2
			33	TYR	2
			34	ABCC1	2
			35	ABCB1	2
			36	APOB	2
			37	BDNF	2
			38	CCL2	2
			39	LDLR	2
			40	PPARA	2
			41	RAPGEF1	2
			42	ABCA1	2
			43	IL10	2
			44	SLCO1B1	2
			45	TNF	2

Appendix 3. Related Genes of Meniere's Disease

No.	Gene	No.	Gene	No.	Gene	No.	Gene
1	FAM136A	32	CTLA4	63	RIMS1	94	LSAMP
2	OTOG	33	AVP	64	BRMS1L	95	TNF
3	MYO7A	34	AQP3	65	LINC01584	96	NOS1
4	COCH	35	IGHE	66	MIR548AP	97	NOTCH3
5	DTNA	36	LOC100506071	67	MTHFR	98	TPO
6	NAGA	37	AQP5	68	HSPA1A	99	SDHB
7	AQP2	38	IFNG	69	PSMD4	100	FCGR2B
8	CDH23	39	CSN1S1	70	ADRB2	101	FUCA1
9	ADGRV1	40	ACE	71	ITGB3	102	INS
10	USH1C	41	COTL1	72	IL6	103	CD79A
11	PCDH15	42	EDEM3	73	MTR	104	CASP9
12	SHROOM2	43	FAM53B	74	ADRB1	105	CA1
13	C10orf105	44	PLBD2	75	IGES	106	NPPA
14	MIP	45	NPB	76	SLC1A1	107	TG
15	HRH4	46	SLC66A1	77	KCNQ4	108	APOH
16	KCNE1	47	IL4	78	TOMM20	109	IL1A
17	KCNE3	48	FCER2	79	HCFC1	110	MICA
18	HSPA8	49	AQP7	80	ADD1	111	ZBED2
19	OCM2	50	SLC44A2	81	ADD3	112	NLRP3
20	HSPA4	51	PTGFR	82	ADD2	113	NF2
21	GJB2	52	NFKB1	83	HRH1	114	POU4F3
22	SLC26A4	53	PRKCB	84	HRH3	115	GRHL2
23	DCAF8	54	HLA-C	85	SKP1	116	PIK3CA
24	AQP4	55	CCL5	86	NOS2	117	CFTR
25	AQP1	56	SEMA3D	87	TRPV4	118	KCNJ1
26	HLA-DRB1	57	TLR10	88	GLA	119	P2RY2
27	AQP6	58	NTN4	89	SERPINC1	120	OTOL1
28	AVPR2	59	DPT	90	CD40LG	121	CCL2
29	AGA	60	MIF	91	F3		
30	PARP1	61	F2	92	FCGR3A		
31	PTPN22	62	F5	93	HLA-DQB1		