

배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃芩이 유전자 표현에 미치는 영향

김성배, 정승현, 신길조, 이원철
동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Scutellaria baicalensis GEORGI on Gene Expression in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells

Sung-Bae Kim, Sung-Hyun Chung, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee
Dept. of Oriental Medicine The Graduate School, Dongguk University

Objectives : The purpose of this investigation is to evaluate the effects of Scutellaria baicalensis GEORGI on alteration in gene expression in a hypoxia model using cultured rat cortical cells.

Methods : E18 rat cortical cells were grown in a Neurobasal medium containing B27 supplement. On 12 DIV, Scutellaria baicalensis GEORGI(20 ug/ml) was added to the culture media and left for 24 hrs. On 11 DIV, cells were given a hypoxic insult (2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hrs), returned to normoxia and cultured for another 24 hrs. Total RNA was prepared from Scutellaria baicalensis GEORGI-untreated (control) and -treated cultures and alteration in gene expression was analysed by microarray using rat 5K-TwinChips.

Results : For most of the genes altered in expression, the Global M values were between -0.5 to +0.5. Among these, 1143 genes increased in their expression by more than Global M +0.1, while 1161 genes decreased by more than Global M -0.1. Effects on some of the genes whose functions are implicated in neural viability are as follows:

- 1) The expression of apoptosis-related genes such as Bad (Global M = 0.39), programmed cell death-2(Pdcd2) (Global M = 0.20) increased, while Purinergic receptor P2X(P2rx1) Global M = -0.22), Bcl2-like1(Bcl2l1)(Global M = -0.19) decreased.
- 2) The expression of 'response to stress-related genes such as antioxidation-related AMP-activated protein kinase subunit gamma 1 gene (Prkg1) (Global M = 0.14), catalase gene (Global M = 0.14) and Heme Oxygenase(Hmox1) increased.
- 3) The expression of Fos like antigen 2 (Fosl2) expressed in neurons that survive ischemic insult increased (Global M = 0.97).

Conclusions : these data suggest that Scutellaria baicalensis GEORGI increases the expression of antiapoptosis- and antioxidation- related genes in a way that can not yet be explained.

Key Words: GEORGI, hypoxia, microarray, antiapoptosis, antioxidation

1. 緒 論

신경계 질환의 증상 발현은 중추 신경세포의 사멸로 유발되는데, 뇌졸중의 주요증상인 운동, 감각,

인지 기능의 소실 등도 이에 기인된다. 오래 전부터 중추신경세포들은 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 물리-화학적 손상에 아주 민감한 것으로 알려져 왔다. 단지 수분간의 허혈상태 만으로도 중추신경세포는 손상을 입게 되는데, glutamate의 과다한 방출 또는 glutamate receptor의 과다한 흥분에 의하여 비교적 짧은 시간으로도 신경세포의 비가역적 손상이 초래된다. 흥분독성의 기전으로는 이온통로를 통한

· 접수 : 2004. 10. 19 · 채택 : 2004. 11. 8
· 교신저자 : 김성배, 경기도 양주시 덕정동
 봉우마을 519동 1002호
(Tel. 019-518-3667 Fax. 031-710-3780
E-mail : sttcool@chol.com)

갈슘의 세포 내 유입이 중요한 것으로 알려져 왔는데, 최근에는 apoptosis가 신경계 질환의 신경세포사와 관련이 있다는 증거들이 축적되고 있다^{1,2}.

최근 활발히 진행되고 있는 유전체(genome) 연구 중 유전체들의 기능과 구조를 밝히는 새로운 기술의 하나인 DNA microarray는 동일한 실험 조건하의 체계적 방식으로^{3,4} 수천개의 유전자 발현 양상(gene expression profile)을 동시에 분석하여 그 결과를 비교하는 방법으로 최근에는 뇌와 신경계 같은 더욱 복잡한 생물학적 조직의 유전자 발현 분석에 사용되고 있다^{5,7}.

黃芩은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생 초본인 黃芩(*Scutellaria baicalensis* GEORGI)의 뿌리를 건조한 것으로⁸, “性寒, 味苦, 無毒하며 熱毒, 骨蒸, 熱渴, 黃疸, 腸澀泄痢, 痰熱證, 胃熱證을 다스린다.”고 하였다⁹.

임상에서는 羌活愈風湯, 黃連解毒湯, 牛黃清心丸 등에 사용되어 뇌혈관질환, 고혈압, 유행성 뇌척수막염의 치료에 적응증을 나타내는 한약제이다¹⁰.

黃芩의 약리 작용에 대하여는 항균작용, 항염증 작용¹¹, 항allergy작용, 항산화작용¹², 담즙분비촉진작용, 간장해 예방작용, 이뇨작용, 혈압강화작용, 고지혈증 개선작용, 장관운동 억제작용, 해열작용, 진경작용, 항암작용 등이 있음이 보고되어 있다¹³.

최근 黃芩이 손상된 중추신경계 세포를 보호한다는 임상적·실험적 연구 결과들이 많이 발표되었는데, 특히 이 등¹⁰은 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 黃芩의 신경방어효과를, 조 등¹⁴은 임상에서 항치매 효과를, 김 등¹⁵은 세포사망 보호효과 및 대뇌신경 세포사 예방 효과가 있는 것으로 보고하였다. 그러나 지금까지 黃芩이 저산소증에서 신경세포의 전반적인 유전자 표현 변화에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바가 없었다.

이에 본 연구에서는 microarray 기법을 적용하여 저산소증으로 apoptosis를 유발한 흰쥐의 대뇌신경 세포에서 黃芩에 의한 유전자 표현 변화를 조사하여 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약제

실험에 사용된 黃芩(*Scutellaria baicalensis* GEORGI)은 대한약전 및 대한약전의 한약 규격주해¹⁶에 근거하여 동국대학교 경주 한방병원에서 사용되는 黃芩을 정선하여 사용하였다.

2) 黃芩의 물추출액 제조

黃芩(85.227mg)을 12.5ml의 증류수에 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 혼든 후, 이를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45µm) 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1ml 추출액 3 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

2. 방법

1) 신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18 : E18)의 Sprague-Dawley계 흰쥐의 대뇌 피질신경세포는 Brewer 등의 방법¹⁷에 따라 배양하였으며, 黃芩 물추출액은 배양 12일(12 day in vitro : DIV)에 처리하였다. 임신 18일의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아의 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate와 10mM HEPES(pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Gibco, BRL) 5ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1ml HBSS용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정할 다음 약 15,000cells/mm² 되도록 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(Gibco, BRL)(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1ml 25mM glutamate, 0.1ml 25mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(100ml Neurobasal, 2ml B27

supplement, 0.25ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

2) 저산소증 모델

12 DIV에 황芻 물추출액을 20 μ g/ml 농도로 첨가하고, 14 DIV에 CO₂ Water Jacketed Incubator (Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂ 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

3) 황芻 물추출액의 처리와 저산소증 유발

12 DIV에 황芻 물추출액을 20 μ g/ml의 농도로 첨가하고 2일 더 배양한 후 14 DIV에 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂, 37°C 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소환경 배양조에 옮기고 24시간 더 배양하고 total RNA를 분리하였다.

4) RNA 추출

RNA 추출을 위한 배양은 60mm dish를 사용하였다. 저산소증 처리가 끝난 24 시간 후에 배양액을 제거하고 5-10ml의 ice-cold PBS로 수세하였다. PBS를 제거하고 용액D [4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate-2H₂O, 0.5%(w/v) sodium lauryl sarcosinate, 0.1M β -mercaptoethanol] 1ml를 각 culture dish에 넣어 세포를 용해하였다. 용해된 lysate를 microfuge tube에 옮기고 tissue homogenizer로 15-30초간 균질화하였다. 여기에 용액D 1ml 당 0.1ml의 2M sodium acetate(pH 4.0), 1ml의 phenol(4°C), 0.2ml의 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 잘 섞어주었다. tube를 얼음에 15분간 넣어둔 후 원심분리(10,000 \times g, 20분, 4°C)하여 상등액을 취하고 동일 부피의 isopropanol을 넣고 잘 섞어주었다. 이를 -20°C에서 2시간 처리한 후 원심분리(10,000 \times g, 30분, 4°C)하여 RNA를 침전시키고 용액D에 녹였다. 이를 isopropanol로 한번 더 침전시킨 후 75% alcohol로 2회 수세한 후 diethylpyrocarbonate(DEPC)를 처리한 물에 녹이고 -70°C에 보관하였다.

5) Microarray

Microarray는 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여

분석하였다. 실험군은 황芻 물추출액을 처리하였으며, 대조군은 처리를 하지 않고 저산소증을 유발시킨 후 각각의 세포에서 분리한 각각 20-50 μ g의 total RNA로부터 oligo(dT) primer와 역전사효소를 이용하여 first cDNA strand를 만들고, 실험군은 Cy5형 광물질(red)로, 대조군은 Cy3 형광물질(green)로 표시하였다. 두 probe를 1:1 혼합하여 TwinChip™ Rat-5K(Digital Genomics)를 hybridization[3X Sodium saline citrate(SSC), 42°C, 16시간]하고 최종적으로 0.1X Sodium saline citrate(SSC)로 상온에서 1분씩 4회 수세하였다.

III. 結 果

1. microarray 결과

본 연구에 적용한 모델에서 신경세포는 저산소증 유발 후 1일에는 거의 영향을 받지 않다가 3일 후부터 급격히 사망하기 시작하였다. 따라서 저산소증 유발 후 첫째 날 이후 많은 유전자가 표현이 달라질 것으로 예상하여, 본 실험에서는 12 DIV에 황芻 물추출액 20 μ g/ml를 처리하고 둘째 날에 저산소증을 유발하였으며 셋째 날에 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 이때 소량의 RNA를 분석하여 A₂₆₀/A₂₈₀의 값이 1.5 이상이고, 28S rRNA/18S rRNA의 값이 2.0 이상인 최소로 분해된 RNA만을 사용하였다. microarray 전문회사인 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 TwinChip™Rat-5K microarray chip을 분석한 chip의 형광사진을 촬영하였다(Fig. 1). 이때 황芻 물추출액을 처리한 실험군은 Cy5 형광물질(red)로, 대조군의 RNA는 Cy3 형광물질(green)로 표시하였다. TwinChip의 upper array와 lower array의 형광 image가 서로 매우 유사하여 재현성이 높음을 알 수 있었다. MA plot에서 [M = log₂(R/G), A = {log₂(R x G)}/2] 대부분의 M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 정도의 증감을 나타내었다. 이 가운데 Global M 값이 +0.1 이상 즉 7% 이상 표현이 증가한 유전자는 1143 종, -0.1 이하 즉 7% 이상 표현이 감소한 유전자는 1161 종이었다.

2. apoptosis 관련 유전자 표현의 변화

apoptosis 관련 유전자중 저산소증에서 黄芩 물추출액에 의하여 표현이 변화되는 유전자는 10개였다. 이 가운데 4개는 표현이 증가하였으며, 6개는 감소하였다(Table 1). 이 가운데 proapoptosis 유전자 중 Bad(Global M = 0.39)와 programmed cell death-2 (이하 Pcd2)는 증가하였고(Global M = 0.20), Purinergic receptor P2X(이하 P2rx1)는 감소하였다

(Global M = -0.22). 반면 Antiapoptosis 유전자인 Bcl2-like1(이하 Bcl2l1)은 다소 감소하였다(Global M = -0.19).

3. 세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 표현의 변화

세포의 성장과 유지에 관련된 유전자중 저산소증에서 黄芩 물추출액에 의한 유전자 표현변화는, Global M 값이 0.1 이상인 34개는 표현이 증가하였

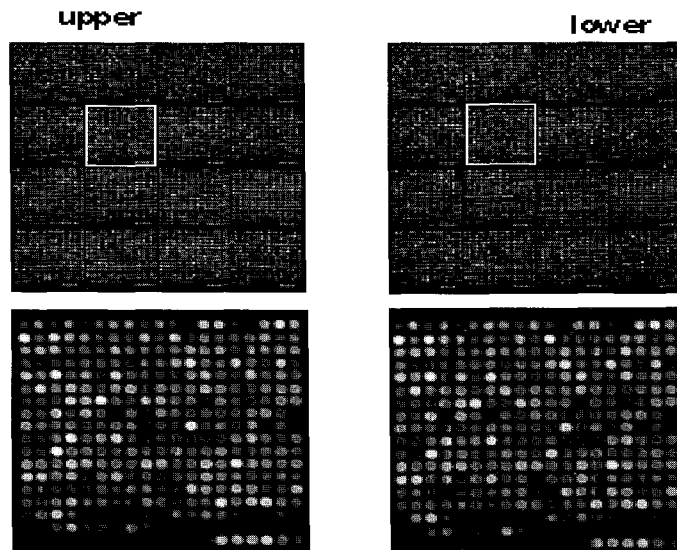


Fig. 1. Pseudocolor image maps.

The control cDNA (Scutellaria baicalensis GEORGI(黄芩)-untreated culture) and sample cDNA (Scutellaria baicalensis GEORGI(黄芩)-treated culture) were labeled with Cy3 (green) and Cy5 (red) fluor, respectively. Images of the upper array (upper) and lower array (lower) of the TwinChip™Rat-5K microarray chip (Digital Genomics, Seoul) are shown. One section of the two arrays are shown in magnification (bottom images).

Table 1. Apoptosis-related genes whose transcription are altered by Scutellaria baicalensis GEORGI(黄芩) in hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Bad	0.38983	10.03298	bcl-2 associated death agonist
Pcd2	0.20226	10.17154	programmed cell death 2
Hmox1	0.05475	11.88187	Heme oxygenase
Tp53	0.0285	11.96045	tumor protein p53
Ngfr	-0.05177	11.41948	nerve growth factor receptor
Akt1	-0.08892	13.67755	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Cycs	-0.09805	14.14004	cytochrome c, somatic
Bid3	-0.09911	10.78095	BH3 interacting domain 3
Bcl2l1	-0.19059	8.825807	Bcl2-like 1
P2rx1	-0.21926	9.943286	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1

으며(Table 2), -0.1 이하인 30개는 감소하였다(Table 3). 그 중 Thymus cell surface antigen(Thy1), Tuberos sclerosis 2(Tsc2) 등이 증가하였고(Global M = 0.70, 0.56), Solute carrier family 12, member1 (Slc12a1), Solute carrier protein2, liver(Scp2), Protein phosphatase type1 alpha, catalytic subunit (Ppp1ca) 등은 감소하였다(Global M = -1.06, -0.70,

-0.60).

4. 세포주기 관련 유전자 표현의 변화

세포주기 관련 유전자중 저산소증에서 黃芩 물추출액에 의하여 8개는 표현이 증가하였으며, 7개는 감소하였다(Table 4). 그러나 표현변화의 정도는 미약하였다.

Table 2. Growth and maintenance-related genes which are up-regulated by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia. Only those genes with Global M values above 0.1 are shown

Gene Symbol	global.M	A	Title
Thy1	0.699	7.8478	Thymus cell surface antigen
Tsc2	0.5644	8.6879	Tuberos sclerosis 2, (renal carcinoma)
Myr5	0.3661	7.25723	Unconventional myosin from rat 3
Rps8	0.3202	12.236	ribosomal protein S8
Slc6a4	0.3197	9.94858	solute carrier family 6, member 4
Slc2a4	0.2328	11.3739	solute carrier family 2, member 4
Erp29	0.218	12.2067	endoplasmic reticulum protein 29
Pxmp3	0.2051	12.5447	peroxisomal membrane protein 3
H1f0	0.1995	13.0185	Histone H1-0
Akt2	0.199	8.97523	Murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog 2
Clcn2	0.1924	12.1862	chloride channel 2
Vegf	0.1813	11.6848	vascular endothelial growth factor
Id2	0.1797	14.8835	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
Slc16a1	0.172	11.4339	solute carrier family 16, member 1
Slc7a1	0.1632	9.95722	solute carrier family 7, member 1
Polb	0.1621	9.35708	DNA polymerase beta
Thy1	0.1585	10.8664	Thymus cell surface antigen
Rps14	0.1487	12.0087	ribosomal protein S14
Rpl29	0.1483	10.3821	ribosomal protein L29
Myh11	0.1396	12.2885	myosin heavy chain 11
Vhl	0.1346	12.2161	von Hippel-Lindau syndrome homolog
Actg2	0.1324	11.8862	actin, gamma 2
P2rx4	0.1306	10.5474	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4
Slc9a1	0.1268	11.5549	solute carrier family 9, member 1
Myh6	0.1265	11.4878	myosin heavy chain, polypeptide 6
Cdc5l	0.1245	12.3663	cell division cycle 5-like (S. pombe)
Pttg1	0.1223	10.5661	pituitary tumor-transforming 1
Rps17	0.1214	11.0056	ribosomal protein S17
Abcc8	0.1201	13.5859	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 8
Slc28a2	0.1179	10.6941	solute carrier family 28, member 2
Pxmp2	0.1146	13.3714	peroxisomal membrane protein 2
Abcd3	0.1131	12.3809	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3
Slc2a1	0.1096	9.65072	solute carrier family 2, member 1
Apoc3	0.1095	9.94143	apolipoprotein C-III

Table 3. Growth and maintenance-related genes which are down-regulated by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia. Only those genes with Global M values below -0.1 are shown.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Gc	-0.1161	10.5	Group-specific component (vitamin D-binding protein)
Myo1e	-0.1234	10.2	myosin 1E
Gosr2	-0.1244	10.6	golgi SNAP receptor complex member 2
Afp	-0.1255	7.75	alpha-fetoprotein
Slc18a2	-0.1371	13.1	solute carrier family 18, member 2
Prnp	-0.1428	12.9	prion protein
Slc19a1	-0.1437	10.2	solute carrier family 19, member 1
Rps7	-0.1456	14.7	ribosomal protein S7
Ftl1	-0.1467	14.1	ferritin light chain 1
Top2a	-0.1483	11.2	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Slc12a3	-0.1576	13.3	solute carrier family 12, member 3
Apoe	-0.1641	14.6	apolipoprotein E
Slc1a2	-0.1659	11.3	solute carrier family 1, member 2
Slc2a3	-0.1754	8.52	solute carrier family 2, member 2
Tnp2	-0.1822	11.9	transition protein 2
Syt5	-0.186	10.2	synaptotagmin 5
Tmod1	-0.1968	11.4	tropomodulin 1
Atp1a1	-0.1978	12.5	ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1
Cdk4	-0.2018	10.3	cyclin-dependent kinase 4
Gfra1	-0.212	9.98	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1
P2rx1	-0.2193	9.94	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
Kcnc1	-0.2412	11.5	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 1
Slc28a2	-0.2613	13.2	solute carrier family 28, member 2
Ccng1	-0.2738	12.2	Cyclin G1
Ptgds	-0.3425	10.9	Prostaglandin D synthase
Cacnb3	-0.405	13.2	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
Htr3a	-0.4187	12	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3a
Ppp1ca	-0.6002	15.1	Protein phosphatase type 1 alpha, catalytic subunit
Scp2	-0.6954	9.16	Sterol carrier protein 2, liver
Slc12a1	-1.0585	10.6	solute carrier family 12, member 1

Table 4. Cell cycle-related genes which are altered by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Id2	0.179738	14.9	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
Polb	0.162078	9.36	DNA polymerase beta
Cdc5l	0.124478	12.4	cell division cycle 5-like (S. pombe)
Cdkn1b	0.052802	10.8	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Rbl2	0.050255	12.2	retinoblastoma-like 2
Nfib	0.009071	11.6	nuclear factor I/B
Ddit3	0.0061	13.1	DNA-damage inducible transcript 3
Pmp22	0.002023	13.8	peripheral myelin protein 22
Top2a	-0.02967	11.8	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Ccnd3	-0.03848	13.6	Cyclin D3
Ccng1	-0.04698	15.6	Cyclin G1
Top2a	-0.14825	11.2	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Cdk4	-0.20181	10.3	cyclin-dependent kinase 4
Ccng1	-0.27379	12.2	Cyclin G1
Ppp1ca	-0.60017	15.1	Protein phosphatase type 1 alpha, catalytic subunit

5. 스트레스 반응 관련 유전자 표현의 변화

스트레스 반응관련 유전자는 저산소증에서 黃芩 물추출액에 의하여 6개는 표현이 증가하였으며, 9개는 감소하였다(Table 5). 이 가운데 항산화관련 유전자인 AMP-activated protein kinase subunit gamma 1 gene(이하 Prkag1)(Global M = 0.14), catalase (Global M = 0.14), Heme oxygenase(이하 Hmox1) 유

전자(Global M = 0.05)의 표현이 약간 증가하였다.

6. 신호전달 관련 유전자 표현의 변화

신호전달 관련 유전자는 저산소증에서 黃芩 물추출액에 의하여 21개는 표현이 증가하였으며(Table 6), 10개는 감소하였다(Table 7).

Table 5. 'Response to stress'-related genes which are altered by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Prkag1	0.14499	12.4	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
Cat	0.14342	11	Catalase
Cat	0.12187	10.4	Catalase
Nfkb1	0.08415	13.8	nuclear factor kappa B p105 subunit
Hmox1	0.05475	11.9	Heme oxygenase
Fn1	0.03395	14.4	Fibronectin 1
Il1b	-0.0051	13.8	Interleukin 1 beta
C3	-0.0297	14.2	Complement component 3
B2m	-0.0312	12.8	Beta-2-microglobulin
F2	-0.0432	11.2	coagulation factor 2
Pla2g1b	-0.0613	9.61	phospholipase A2, group 1B
Crp	-0.0633	12	C-reactive protein
Pap	-0.0877	12.8	pancreatitis-associated protein
Epo	-0.1044	10.6	Erythropoietin
Adm	-0.1201	11.4	adrenomedullin

Table 6. Signal transduction-related genes which are up-regulated by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Tsc2	0.5644	8.69	Tuberous sclerosis 2, (renal carcinoma)
Plcg1	0.3337	11	Phospholipase C, gamma 1
Syk	0.2885	12.4	Spleen tyrosine kinase
Arreb2	0.2603	12.9	Arrestin, beta 2
Il6r	0.2596	8.39	interleukin 6 receptor
Ddr1	0.2319	12.7	Discoidin domain receptor family, member 1
Lhcgr	0.1909	8.91	Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
Mog	0.1707	10.4	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
Limk1	0.1624	10.3	LIM motif-containing protein kinase 1
Madh7	0.1561	9.16	MAD homolog 7 (Drosophila)
Stmn1	0.1439	10.2	stathmin 1
Tac1	0.1431	10.2	Tachykinin (substance P, neurokinin A, neuropeptide K, neuropeptide gamma)
Gucy2c	0.1412	10.5	guanylate cyclase 2C
Pak3	0.1351	14.2	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3
Ptpn11	0.1324	12.6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
Mbp	0.1255	13.1	Myelin basic protein
Dgkb	0.1234	8.77	diacylglycerol kinase, beta
Stmn1	0.1201	14.5	stathmin 1
Sag	0.1152	14.2	S-antigen
Pnoc	0.1116	13.7	Prepronociceptin (neuropeptide nociceptin) (N23K)
Ptprd	0.1076	11.4	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D

7. 전사(transcription) 관련 유전자 표현의 변화

전사 관련 유전자는 저산소증에서 黃芩 물추출액에 의하여 13개는 표현이 증가하였으며(Table 8), 10개는 감소하였다(Table 9). 이 가운데 허혈성 손상

후에도 신경세포를 생존시키는 뉴런에서 표현되는 Fos like antigen 2(이하 Fosl2)(Global M = 0.97)의 표현이 의미있게 증가하였다.

Table 7. Signal transduction-related genes which are down-regulated by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Map2k1	-0.1132	13.2	mitogen activated protein kinase kinase 1
Ephb2	-0.1163	12.8	Eph receptor B2
Gng7	-0.1306	14.1	guanine nucleotide binding protein, gamma 7
Nrgn	-0.1326	11.9	neurogranin
Gprk2l	-0.1593	11.9	G protein-coupled receptor kinase 2, groucho gene related (Drosophila)
Ptpro	-0.1729	11.2	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
Pik4cb	-0.2095	8.99	phosphatidylinositol 4-kinase
Gfra1	-0.212	9.98	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1
Adcy6	-0.2147	13.4	adenylyl cyclase 6
Mapk1	-0.8816	9.31	mitogen activated protein kinase 1

Table 8. Transcription-related genes which are up-regulated by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Fosl2	0.9733	7.5	Fos like antigen 2
Copeb	0.4236	9.17	core promoter element binding protein
Titf1	0.225	13.8	Thyroid transcription factor 1 TTF-1 NK-2 (Drosophila) homolog A (thyroid nuclear factor)
Nfyb	0.2033	9.89	nuclear transcription factor - Y beta
Pdcd2	0.2023	10.2	programmed cell death 2
Adora2a	0.1982	11.7	adenosine A2a receptor
Cebpb	0.1955	11.8	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
Madh7	0.1561	9.16	MAD homolog 7 (Drosophila)
Gata6	0.1533	10.2	GATA-binding protein 6
Dbp	0.1386	10	D site albumin promoter binding protein
Vhl	0.1346	12.2	von Hippel-Lindau syndrome homolog
Cdc5l	0.1245	12.4	cell division cycle 5-like (S. pombe)
Gata1	0.1144	10.8	GATA-binding protein 1 (globin transcription factor 1)

Table 9. Transcription-related genes which are down-regulated by *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) in hypoxia.

Gene Symbol	global.M	A	Title
Nr3c1	-0.1294	10.8	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
Top2a	-0.1483	11.2	topoisomerase (DNA) 2 alpha
Runx1	-0.1645	11.1	Runt related transcription factor 1
Egr4	-0.1688	11.5	early growth response 4
Yy1	-0.1929	10.6	YY1 transcription factor
Fosl1	-0.2041	11.3	Fos-like antigen 1
Nr1h2	-0.2092	9.73	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
Irf1	-0.2377	12.8	Interferon regulatory factor 1
Myf6	-0.297	11.8	myogenic factor 6
Nfyc	-0.3622	10.5	nuclear transcription factor-Y gamma

IV. 考 察

黃芩은 꿀풀科(Labiatae)에 속한 다년생 초본인 黃芩 (*Scutellaria baicalensis* GEORGI)의 뿌리를 剝皮하여 건조한 것^{18,19}으로, <神農本草經>¹⁹에 “味苦平, 主諸熱黃疸, 腸澼洩利, 逐水, 下血閉, 惡瘡疽蝕, 火瘍”이라고 최초로 문헌에 수록된 이래 瀉實火, 除濕熱, 止血, 安胎의 효능이 있어 중풍 급성기에 多用되며, 防風通聖散²⁰, 牛黃清心元⁹, 熱多寒少湯²¹ 등의 중요한 구성 약재중의 하나이다.

黃芩의 주요성분은 baicalin, baicalein, woogonin 등의 flavonoid 성분으로 지질 과산화 효소 활성억제로 인한 항알러지, 과산화지질 생성억제에 의한 간장 손상 보호, 세포면역 촉진, 신장독성 감소, 이뇨작용, 진정작용, 혈관 이완 작용, 해열, 항염, 항균, 항바이러스, 강압, 간의 이물배설기능, 이담작용과 지질대사 개선, 모세혈관 투과성 억제, 항암작용 등이 보고되었으며, 바이러스성 간염, 골반염, 담낭염, 백내장 등에 응용되고 있다^{22,23}.

黃芩에 관한 실험적 연구로 이 등²⁴은 黃芩이 면역기능, 미생물증식 및 세균변이에 미치는 영향을, 김²⁵은 黃芩의 혈관이완효과를, 이 등²⁶은 黃芩 및 황련 열추출물의 아질산염 소거작용을, 박 등²⁷은 활성산소의 유해작용에 대한 黃芩 성분의 생체 보호작용에 관한 연구 등을 보고하였다.

특히 이 등¹⁰은 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 黃芩의 신경방어효과를 보고하였으며, 조 등¹⁴은 임상에서 항치매 효과가 있음을 보고하였다. 김 등¹⁵의 연구에 의하면 정상산소 환경에서 黃芩은 20 μ g/ml까지 대뇌 신경세포 독성이 없었으며, 약 10% 세포사망 보호효과를 나타내었고, 저산소증 모델에서도 apoptosis 기전 중 Bcl-2의 표현 증가, caspase-3의 activity 감소에 유효하게 작용하여 뇌졸중 발병 후 발생하는 대뇌신경 세포사 방지에 예방 효과가 있는 것으로 나타났다.

신경세포사는 크게 necrosis와 apoptosis의 두 가지 형태가 있다. necrosis는 세포내 이온의 급격한 불균형, 세포질과 mitochondria의 팽창, 세포질 용해

후 핵막의 파괴에 의해 유도된다. Apoptosis는 내인성 세포자살 프로그램을 통해 원치않는 여분의 세포를 제거하는 과정인데, caspase의 생화학적 조절에 의하여 중국에는 생화학적 cascade에서 DNA의 분절화를 일으키는 역할을 하는 것으로 보인다²⁸. 또한 Apoptosis는 세포막상에서 세포크기의 축소, 세포막융기의 돌출 및 apoptosis 소포체를 형성하며, 세포내에서 염색사용촉, 핵분절, DNA분절과 같은 특이한 변화를 동반한다^{29,30}.

지금까지 의학을 포함한 생명과학 분야에서 대부분의 연구는 관심의 대상이 되는 특정 유전자를 먼저 선정하고, 그 유전자 발현의 변화에 초점을 맞춘 연구가 주종을 이루어왔다. 그 방법으로 mRNA에 대한 실험은 northern blot이나 in situ hybridization 이, 단백질 수준에서의 변화는 western blot이나 면역세포화학법(immunocytochemistry)을 이용한 실험이 이용되어 왔다. 그러나 최근 동 시간대에 변화를 보이는 많은 유전자를 한꺼번에 관찰할 수 있는 기법들이 개발되었는데, differential display, subtraction hybridization³¹, 가장 최근에 개발되어 사용되고 있는 cDNA microarray 기법 등이 있다^{32,33}. cDNA microarray는 검사속도 및 반복 검사 시 일관성 있는 결과를 얻을 확률이 가장 높다는 점에서 관심의 대상이 되고 있다. 이 방법은 다양한 조건에서 수백 혹은 수천 개 유전자의 발현 변화를 동시에 관찰할 수 있는 획기적인 실험 기법으로, 최근에는 관련된 유전자끼리 그룹화한 microarray가 상품화되어 검사가 더욱 용이해졌다³⁴.

본 연구에서는 microarray 기법을 적용하여 저산소증으로 apoptosis를 유발한 흰쥐의 대뇌신경세포에서 유전자의 표현을 조사하였다.

TwinChip의 upper array와 lower array의 형광 image가 서로 매우 유사한 것으로 보아 본 실험이 재현성이 높음을 알 수 있었다. 이 가운데 Global M 값이 +0.1 이상, 즉 7% 이상 표현이 증가한 유전자가 1143 종, -0.1 이하, 즉 7% 이상 표현이 감소한 유전자가 1161 종이었다. 그러나 대부분의 Global M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 약 40% 내외의 증

감을 나타내었다. 이러한 사실은 黃芩에 의하여 많은 유전자들의 표현이 변화되나 그 변화범위가 크지 않음을 시사한다.

Apoptosis 관련 유전자 가운데 proapoptosis 유전자인 Bad³⁶, Pdc2³⁶는 증가하였고, P2rx1³⁷은 감소하였다. 반면 Antiapoptosis 유전자인 Bcl211³⁸은 다소 감소하였다. 그러나 apoptosis를 방지하는 黃芩 물추출액이 apoptosis 촉진 유전자인 Bad 및 Pdc2의 표현을 증가시키고, apoptosis 억제 유전자인 Bcl211의 표현을 더 감소시킨 이유는 현재로서는 설명하기 어렵다.

세포의 성장과 유지에 관련된 유전자는 저산소증에서 黃芩 물추출액에 의하여 많은 표현변화가 있었으며, 34개는 표현이 증가하였고 30개는 감소하였다.

세포주기 관련 유전자중 8개는 표현이 증가하였으며, 7개는 감소하였으나 표현변화의 정도는 미약하였다. 이는 세포분열을 하지 않는 신경세포이기 때문일 것으로 추정된다.

스트레스 반응 관련 유전자 가운데 catalase는 과산화수소(H₂O₂)를 중화하여 물과 산소로 전환시키는 항산화효소로서 저산소증에서는 catalase mRNA가 증가된다^{39,40}. Prkag1은 5'-AMP-activated protein kinase(이하 AMPK) gamma subunit로서, AMPK는 ATP 수위를 조절하여 ATP가 고갈되는 상황에서 세포보호 작용을 나타낸다⁴¹. 또한 heme을 biliverdin, iron 및 CO로 분해⁴²하는 Hmox1도 약간 증가되었다. Biliverdin은 biliverdin reductase에 의하여 bilirubin이 되는데, biliverdin과 bilirubin은 강한 항산화 활성(antioxidant activity)을 갖기 때문에 저산소증으로 유발된 산화적 손상을 방어할 것으로 보인다^{43,44}. 따라서 저산소증으로 인한 산화적 손상과 에너지 고갈 상태를 극복하고자 하는 catalase, Hmox1 및 Prkag1 유전자들의 표현증가는 매우 타당한 것으로 이해된다.

신호전달 관련 유전자는 저산소증에서 黃芩 물추출액에 의하여 21개는 표현이 증가하였고, 10개는 감소하였다.

전사 관련 유전자 중 허혈성 손상 후에도 신경세포를 생존시키는 neuron에서 나타나는 Fos12의 표현이 의미있게 증가하였다. Fos12는 허혈성 손상 후 신경세포의 적응에 관련된 전사 인자로서의 역할을 하는 것으로 알려졌다⁴⁵. 따라서 Fos12 유전자 표현 증가는 세포 보호 효과가 있는 것으로 추정된다.

이상의 결과에서 黃芩 물추출액은 저산소증으로 야기된 proapoptosis 유전자 표현을 증가시키고 antiapoptosis 유전자 표현을 감소시켜 부정적인 영향을 주는 것으로 나타났고, 항산화 등의 유전자 표현을 증가시키고 전사 인자인 Fos12 유전자의 표현을 증가시킨 것은 긍정적인 영향을 끼친 것으로 나타났다. 따라서 현재로서는 黃芩 물추출액의 세포보호효능을 설명하는데 있어 이러한 상반된 결과를 설명하기에는 많은 어려움이 있어 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

본 연구에서는 배양한 대뇌 신경세포를 이용하여 黃芩이 저산소증에서 유전자표현에 미치는 영향을 microarray 방법으로 조사하였다. 세포사와 관련된 중요한 유전자의 표현변화를 보면 다음과 같다.

1. 표현이 변화한 유전자의 대부분의 Global M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 이내의 증감을 나타내었다. 이 가운데 Global M 값이 +0.1 이상 즉 7% 이상 표현이 증가한 유전자가 1143 종, -0.1 이하 즉 7% 이상 표현이 감소한 유전자가 1161 종이였다.
2. Proapoptosis 유전자 중 Bad, Pdc2는 증가하고 P2rx1은 감소하였으며, antiapoptosis 유전자인 Bcl211은 감소하였다.
3. 스트레스 반응 관련 유전자 중 항산화관련 유전자인 Prkag1, catalase 및 Hmox1의 표현이 약간 증가하였다.
4. 전사 관련 유전자 중 허혈성 손상을 생존시키는 neuron에서 나타나는 Fos12의 표현이 의미있게 증가하였다.

이상의 결과를 요약하면 저산소증에서 黃芩 물추출액은 항산화 유전자와 허혈성 손상 후 신경세포의 적응에 관련된 전사 인자 역할을 하는 것으로 알려진 Fos12 등의 유전자를 주로 표현시켜 신경세포를 보호하는 것으로 이해된다. 그러나 pro-apoptosis 유전자를 증가시키고 anti-apoptosis 유전자는 오히려 감소시킨 현상은 현재로서는 설명하기에 많은 어려움이 있어 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

參考文獻

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 1972;26:239-45.
- 고재영, 김양희. 신경계질환에서의 아포토시스. 서울:윌드사이언스; 1998, pp.147-65.
- Schenm M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 1995;270:467-70.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet. Jan 1999;21(1):10-4.
- Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munsun PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. Ann Neurol. 1999;46:425-8.
- Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH 3rd, Becker KG, Ko MS. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:9127-32.
- Colantuoni C, Purcell AE, Bouton CM, Pevsner J. High throughput analysis of gene expression in the human brain. J Neurosci Res. 2000;59: 1-10.
- 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울:영림사; 1991, p.178.
- 許俊. 原本東醫寶鑑. 서울:남산당; 1998, p.1195.
- 이병철, 임강현, 김영옥, 김선려, 안덕균, 박호균, 김호철. 黃芩의 4-VO로 유발한 흰쥐 뇌허혈에 대한 신경방어효과. 대한분초학회지. 1998; 14(2):89-96
- Michinori Kubo, Hideaki Matsuda, Motoharu Taknaka, Yoshiyuki Kimura, Hiromichi Okuda, Masayuki Hiashino, Tadato Tani, Kensuke Namba, Shigeru Arichi. Studies on Scutellariae Radix VII. anti-arthritic and anti-inflammatory actions of methanolic extract and flavonoid compounds from Scutellariae Radix, Chem. Pharm. Bull. 1984;32(7).
- Krieglstein J. Tharmacology and drug therapy of cerebral ischemia. In: Cerebral ischemia and resuscitation (Schurr A, Rigor BM, eds). Boca Raton CRC; 1990, pp.347-71.
- 國家中醫藥管理局. 中華本草. 上海: 上海科學技術出版社; 1998, pp.1682-94.
- 조기호, 문상관, 고창남, 김영석, 배형섭, 이경섭. 중풍질환의 한·양방 협진체계 가이드라인을 위한 시도(1). 제2회 대한중풍학회 추계학술대회. 2001, pp.21-30.
- 김경훈, 정수현, 김재우, 엄형섭, 정승현, 신길조, 이원철, 문일수. 황금이 저산소증으로 유발된 대뇌신경세포의 세포사에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(3):396-405.
- 지형준, 이상인. 대한약전외 한약(생약) 규격집 주해서. 서울:한국메디칼인텍스사; 1997, p.638.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., and Price, P. J. Optimized survival of

- hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 1993;35:567-76.
18. 지형준, 이상인, 안덕균. 한약규격주해 제2개정. 서울:한국메디칼인텍스사; 1998, pp.686-8.
 19. 孫聖衍. 撰: 神農本草經. 臺北:文光圖書有限公司; 1982, pp.149-50.
 20. 黃度淵. 方藥合編. 서울:南山堂; 1989, pp.120-3.
 21. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울:여강출판사; 1992, p.272.
 22. 김형균. 한약의 약리. 서울:고려의학; 2000, pp.222-7.
 23. 문관성. 약초의 성분과 이용. 평양:과학백과사전출판사; 1999, pp.618-20.
 24. 이정호, 신숙정, 문용. 황금 추출물이 면역기능, 미생물증식 및 세균번이에 미치는 영향. 대한면역학회지. 1998;20:343-8.
 25. 김호현. 황금의 혈관이완효과에 대한 기전. 한의학연구소 논문집. 1998;1:55-70.
 26. 이문조, 박진우, 김용주, 오정석, 최달영, 김준기. 황금 및 황련 추출물의 아질산염 소거작용에 관한 연구. 병리학회지. 2000;14(2):9-17.
 27. 박수남, 홍장후, 박민경. 활성산소의 유해작용에 대한 황금 성분의 생체 보호작용에 관한 연구. 서울산업대. 1997;45(1):189-99.
 28. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death:the significance of apoptosis. *Inr Rev Cytol.* 1980; 68:251-306.
 29. 원철환, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 배양 대뇌신경세포의 저당-저산소증 모델에서 牛黃淸心丸에 의한 세포사 방지 연구. 한의학회지. 2002;23(4):125-39.
 30. Heron A, Pollard H, Dessi F et al. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. *J. Neurochem.* 1993;61:1973-6.
 31. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992;257: 967-71.
 32. Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D. et al: Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science.* 1996;274:610-4.
 33. Schena M, ShalonD, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93: 10614-9.
 34. Cirelli C, Tononi G. Differences in brain gene expression between sleep and waking as revealed by mRNA differential display and cDNA microarray technology. *J Sleep Res.* 1999;8:S44-S52.
 35. Owens, G. P., Hahn, W. E., & Cohen, J. J. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11:4177-88.
 36. Kang JQ, Chong ZZ, Maiese K. Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Mol Pharmacol.* 2003;64(3):557-69.
 37. Nihei OK, de Carvalho AC, Savino W, Alves LA. Pharmacologic properties of P(2Z)/P2X(7)receptor characterized in murine dendritic cells: role on the induction of apoptosis. *Blood.* 2000;96(3):996-1005.
 38. Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74:609-19.
 39. Martin R, Fitzl G, Mozet C, Martin H, Welt K, Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys.

- Exp Gerontol. 2002;37(12):1481-7.
40. Lievre V, Becuwe P, Bianchi A, Bossenmeyer-Pourie C, Koziel V, Franck P, Nicolas MB, Dauca M, Vert P, Daval JL. Intracellular generation of free radicals and modifications of detoxifying enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia. *Neuroscience*. 2001;105(2):287-97.
41. Shamsadin R, Jantsan K, Adham I, Engel W. Cloning, organisation, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Prkag1 gene. *Cytogenet Cell Genet*. 2001;92(1-2):134-8.
42. Liu Yi, Ortiz de Montellano PR. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J Biol Chem*. 2000;275:5297-307.
43. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235:1043-6.
44. Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J Neurosci Res*. 2002;69(4):550-8.
45. Pennypacker KR, Eidizadeh S, Kassed CA, O'Callaghan JP, Sanberg PR, Willing AE. Expression of fos-related antigen-2 in rat hippocampus after middle cerebral arterial occlusion. *Neurosci Lett*. 2000;289(1):1-4.