

紫河車 藥鍼液0| Lipopolysaccharide로 처리된 RAW 264.7 大食細胞柱의 遺傳子 發顯에 미치는 影響

장현석, 이정민, 임성철, 엄동명*, 서정철
대구한의대학교 한의과대학, *한국한의학연구원

Abstract

Microarray Analysis of Gene Expression in Raw 264.7 Cells Treated with Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution

Jang Hyunseok, Lee Kyungmin, Lim Sungchul, Eom Dongmyung*, Seo Jungchul
College of Oriental Medicine, Daegu Haany University
* Korea Institute of Oriental Medicine

Hominis Placenta has a broad array of clinical applications in Korean medicine, including treatment of inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis. The purpose of this study is to explore the global gene expression profiles in human RAW 264.7 cell lines treated with Hominis Placenta herbal-acupuncture solution (HPHAS) using microarray analysis.

The RAW 264.7 cells were treated with lipopolysaccharide (LPS), HPHAS, or both. Of the 8,170 genes profiled in this study, with a cut-off level of two-fold change in the expression, 72 genes (CTD1, regulating synaptic membrane exocytosis 2, etc.) were upregulated and 135 genes (splicing factor, arginine/serine-rich 1, actinin, alpha 1, etc.) downregulated following LPS treatment. One gene (acrosin) was upregulated and 12 genes (phospholipase A2, group IB, neurofilament, heavy polypeptide 200kDa, etc.) were downregulated following HPHAS treatment. Eleven genes (RAB27A, member RAS oncogene family, eosinophil peroxidase, etc.) were upregulated and 16 genes (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian), RW1 protein, etc.) were downregulated following co-stimulation of HPHAS and LPS.

It is thought that microarrays will play an ever-growing role in the advance of our understanding of the pharmacological actions of HPHAS in the treatment of arthritis. Further studies, however, are required to concretely prove the effectiveness of HPHAS.

Key Words: Microarray Analysis, Hominis Placenta, Herbal-Acupuncture Solution, Arthritis

I. 緒論

류마토이드 관절염은 주로 활액성 관절의 활액막 비후와 임파구의 침윤현상을 특징으로 하는 자가면역질환의 일종으로 만성 염증성 질환이다¹⁾.

지역의 차이는 있으나 세계 인구의 약 1%가 발병하여 사회적, 경제적 및 개인적으로 삶의 질에 지대한 영향을 미치는 질병으로 인식되고 있다¹⁾²⁾. 발달된 의료기술로 수많은 질병들이 정복되어 가고 있는 현실 속에서 자가면역 이상으로 인한 질병들은 아직도 정복되지 않은 난치병으로 류마토이드 관절염도 그 중 하나이다.

韓醫學으로 류마토이드 관절염은 歷節風³⁾, 鶴膝風³⁾, 白虎歷節風⁴⁾, 痛風⁵⁾, 痺證⁶⁾, 風痺⁷⁾의 범주에 속하며 原因은 眞陰虛弱精血虧虛⁷⁾, 三陰虛損³⁾ 등 신체가 허약해진 틈을 타 風寒濕邪가 침입하거나 汗出後當風³⁾, 飲酒後當風³⁾ 등으로 인하여 발생하며 治法으로는 去風, 散寒, 除濕, 化痰, 去瘀, 活血, 通絡, 滋補肝腎한다⁸⁾.

Lipopolysaccharide (LPS)는 동물에 각종의 실험적 자가면역 질환을 유발하는 물질로, 대식세포를 자극하여 interleukin-1 (IL-1)의 분비를 유발하여 T 림프구 感作을 촉진시키고, 염증반응 매개물질인 tumor necrosis factor (TNF)- α 의 분비를 유발시키며, prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성도 증가시켜서 일과성의 급성 관절염을 유발한다⁹⁾¹¹⁾.

최근 遺傳子 發顯 정보를 연구하는 방법으로 기존의 개별 遺傳子 發顯을 관찰하던 방법에 비해 DNA chip을 이용함으로써 대량의 遺傳子 發顯 정보를 한꺼번에 평가하는 방법이 시도되고 있다¹²⁾¹³⁾. 韓醫學界에서도 한 등¹⁴⁾, 이 등¹⁵⁾이 DNA chip을 이용하여 鹿茸 藥鍼液과 紅花子 藥鍼液의 遺傳子 發顯 分析 結果를 報告한 바 있다.

紫河車 (Hominis placenta)는 사람의 태반을 건조한 것으로 補氣, 養血, 益精하는 효능이 있다¹⁶⁾. 그 氣味를 추출하여 만든 紫河車 藥鍼液은 주로 慢

性虛勞性 疾患을 치료하는데 사용되고 Bell's palsy¹⁷⁾¹⁹⁾, 睡眠障礙²⁰⁾, 폐렴 후유증²¹⁾, 천식²²⁾, 骨多孔症²³⁾²⁴⁾, 골수부전개선평과²⁵⁾, 산후우울증²⁶⁾, 월경통²⁷⁾, 횡단성 척수염²⁸⁾ 등 難治病 및 慢性疾患에 응용되고 있다. 특히 염 등²⁹⁾은 흰쥐에 Adjuvant 관절염을 유발하여 紫河車 藥鍼液을 응용한 결과 류머티스 관절염 동물 모델의 염증반응을 抑制하는 효과가 있음을 보고하였으나 cDNA chip을 이용한 紫河車 藥鍼液의 遺傳子 發顯 정보는 아직 접하지 못한 실정이다.

이에 저자는 LPS로 염증을 유발시킨 RAW 264.7 cell을 이용하여 紫河車 藥鍼液의 류마토이드 관절염에 대한 효과를 규명하고자 cDNA microarray chip을 통해 遺傳子 發顯 정보를 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

本 實驗에서 사용된 紫河車는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 藥劑科에서 300 g을 精選하여 使用하였고, 세명대학교 한의과대학 본초학교실에 보관된 시료와 비교 검정하는 과정을 거쳤다.

2. 方法

1) 藥鍼液의 調製

紫河車を 破碎하여 25 g의 분말을 500 ml의 蒸溜水에 넣어 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 紫河車와 혼합된 蒸溜水를 13,000 rpm으로 1시간 동안 원심 분리하여 上淸液만을 회수하였다. 上淸液을 멸균된 필터기를 사용하여 얻은 다음 -70°C에서 48시간 동안 냉동 건조시켜 10 g의 건조된 분말을 얻었다.

2) 세포 배양

실험에 사용한 RAW 264.7 cell line(KCLB #40071, 한국세포주 은행)은 DMEM 용액에 10% FBS를 첨가하여 배양하였다. 5% CO₂, 95% 공기, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하고, 배양액은 3일마다 교환하였다.

3) MTT 시험

먼저 RAW 264.7 cell을 96 well plate(Corning, USA)에 well당 배양액 100 μ l에 5 \times 10⁴개의 세포수가 되도록 serum free 배양액에 분주하고 검액으로서 증류수에 희석한 紫河車 藥鍼液을 최종 농도가 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/ml이 되도록 처리하여 6시간 incubation하고, vehicle을 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 10 μ l씩 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution을 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 배양기에 20시간 유치시키고 ELISA reader로 690 nm를 참고 치료 하여 595 nm에서 측정하였다. 모든 실험값은 평균값 \pm 표준편차(mean \pm standard deviation)로 하고, 통계학적 분석은 SAS(Statistic Analysis System) program을 이용하였고, Student's t-test를 실시하여 각 군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다 ($\alpha=0.05$).

4) RNA 추출

처리군과 대조군 각각에서 세포를 배양하여 上淸液을 제거하고 다시 세포를 방치하였다. 세포 107개당 2 ml의 RNAzol B를 사용하여 용해시키고 상온에서 10분간 방치하였다. 0.2 ml chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어 잘 섞어준 후 5분간 상온에서 방치하였다. 4°C에서 12,000 g로 15분간 원심 분리하고 上淸液을 새로운 tube로 옮겨 동량의 isopropanol을 첨가하고 10분간 상온에서 방치하였다. 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심 분리하고 上淸

液을 제거한 후 80% 에탄올 1 ml를 첨가하여 원심 분리하였다. 에탄올을 제거하고 적당량의 DEPC-DDW를 첨가하여 total RNA를 준비하였다.

5) cDNA 준비

Microtube에 10~20 μ g의 total RNA와 3 μ l의 RT primer를 넣고 nuclease free water로 최종 20 μ l가 되도록 섞었다. 80°C에서 10분간 배양 후 얼음에 방치하였다. 이 혼합액에 Superase-In RNase inhibitor 1 μ l를 첨가하였다. 별도의 tube에 5X Superscript II first strand buffer 8 μ l, dNTP mix 2 μ l, 0.1M DTT 4 μ l, Superscript II enzyme 2 μ l (400 units), RNase free water 3 μ l를 혼합하였다. 이 enzyme 혼합액을 RNA가 포함된 상기의 혼합액과 잘 섞어 42°C에서 2시간 반응시켰다. 0.5 M NaOH/50 mM EDTA 7 μ l를 첨가하여 반응을 중지시키고 65°C에 10분 유치시켜 DNA/RNA hybrids를 변성시켰다. 1 M Tris-HCl, pH 7.5를 10 μ l 첨가하여 반응을 중화시켰다. 실험군의 cDNA와 대조군의 cDNA 혼합액을 한 tube로 합치고 10 mM Tris, pH 8.0 16 μ l로 실험군과 대조군 cDNA의 원래 tube를 세척한 후 실험군과 대조군 cDNA 혼합액에 넣어 총 130 μ l가 되도록 하였다.

5 mg/ml linear acrylamide 3 μ l를 상기한 혼합액에 넣고 5 M NaCl 6 μ l 첨가하고 95~100% EtOH 540 μ l 넣고 섞어 -20°C에 30분 방치하였다가 10,000 g 이상으로 15분 원심 분리하였다. 上淸液을 털어내고 cDNA pellet에 70% EtOH 300 μ l 넣어 섞고 10,000 g 이상으로 5분 원심분리하여 上淸液을 털어내고 65°C에 10분~30분 방치해 pellet을 말렸다. Nuclease free water를 넣어 10 μ l가 되게 하여 concentrated cDNA를 녹였다.

6) Microarray

2X formamide based buffer를 55°C에서 10분간 가열을 반복하여 완전히 녹인 것 15 μ l, dT blocker

2 μ l, nuclease free water 3 μ l를 섞고 여기에 위에서 준비한 concentrated cDNA 10 μ l를 넣어 총 30 μ l로 맞추었다. 이 혼합액을 75~80°C 10분, 45~50°C 15~20분간 incubation하고 prewarmed (hybridization 온도에서) microarray에 뿌려 coverslip을 덮고 하루 밤 동안 반응시켰다. Microarray slide를 55~65°C의 2X SSC, 0.2% SDS로 10~15분 세척하고 2X SSC로 상온에서 세척하고 0.2X SSC에 상온에서 10~15분 세척하고, 상온에서 95% EtOH로 씻어 cDNA를 고정시켰다. Microarray slide를 뚜껑이 열린 튜브에 담아 800~1,000 rpm으로 2분 원심 분리하여 건조시켰다. Slide를 stage에 밀어 넣은 후 scan parameter를 기입하고 focus와 laser power를 조정된 후 red와 green의 파장에서 각각 Scanarray Lite (PerkinElmer Life Science, Billerica, MA, USA)를 이용하여 scanning하고, GenePix Pro 3.0(Axon Instruments, Union City, CA, USA)를 이용하여 각각의 spot에 대한 data를 저장하였다. Normalization 과정을 거친 후 대조군에 비해 2배 이상 발현이亢進되거나 1/2 이하로 발현이低下된 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 하여³⁰⁾ LPS나 紫河車 藥鍼液 처치시 변화를 비교하였다.

III. 成績

1. MTT 시험

紫河車 藥鍼液을 처치한 경우 紫河車の 농도가 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/ml일 때의 생존율은 vehicle을 처치했을 때의 대조군에 비해 100.00±25.08, 104.43±20.69, 103.79±10.01 및 114.90±10.10%였다. 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 유의한 감소가 없었다.

2. LPS 처치시 발현이 변화된 遺傳子

유해자극으로서 1 μ g/ml LPS를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이亢進된 遺傳子는 CTD(carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) phosphatase, subunit 1, regulating synaptic membrane exocytosis 2 등으로 72종이 있었고 대조군에 비해 발현이抑制된 遺傳子는 splicing factor, arginine/serine-rich 1(splicing factor 2, alternate splicing factor), actinin alpha 1 등으로 135종이 있었다.

3. 紫河車 藥鍼液 처치시 발현이 변화된 遺傳子

紫河車 藥鍼液을 6시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이亢進된 遺傳子는 acrosin으로 1종이 있었으나 유의하지는 않았고, 대조군에 비해 발현이抑制된 遺傳子는 phospholipase A2, group IB(pancreas), neurofilament, heavy polypeptide 200 kDa 등으로 12종이 있었다.

4. LPS 처치후 紫河車 藥鍼液 처치시 발현이 변화된 遺傳子

유해자극으로서 1 μ g/ml LPS를 3시간 처치후 紫河車 藥鍼液을 6시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 발현이亢進된 遺傳子는 RAB27A, member RAS oncogene family, eosinophil peroxidase 등으로 11종이 있었고, 대조군에 비해 발현이抑制된 遺傳子는 V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G(avian), RW1 protein 등으로 16종이 있었다.

5. 紫河車 藥鍼液 처치시 LPS 처치로 발현이亢進되었던 遺傳子의 변화

LPS 처치후 發顯이 증가된 F-box protein 7, V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1 등의 遺傳子는 紫河車 藥鍼液 처치후 發顯은 M값이 각각 2.08, 1.29에서 -0.94, -1.11 등으로 감소되었다.

6. 紫河車 藥鍼液 처치시 LPS 처치로 發顯이 抑制되었던 遺傳子の 변화

LPS 처치후 發顯이 抑制된 integral membrane protein 2B, ribosomal protein S3 등의 遺傳子는 紫河車 藥鍼液 처치후 發顯은 M값이 각각 -1.20, -1.44에서 0.88, 0.48 등으로 亢進되었다.

IV. 考察

류마티오이드 관절염은 근골격계 질환 중 난치병의 하나로서 대칭되는 사지관절의 통증, 종창, 변형 및 기능상실 등을 주된 증상으로 하는 자가면역성 질환이다¹⁾. 발병요인에 대하여 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없으나, 최근 세포수준과 분자생물학적 측면에서 심층 연구가 진행되면서 활액막의 중앙억제 유전자 변이나 TNF- α 와 결합하는 수용체가 활액막 세포내로의 신호전달에 가담하여 활액막 세포의 apoptosis 불균형을 초래 한다고 보고하는 등 다각적 시도가 이루어지고 있다³¹⁾³²⁾.

한의학에서 류마티오이드 관절염은 痺證⁶⁾, 歷節風³⁾, 白虎風⁴⁾, 痛風⁵⁾ 등의 범주에 속하며 그 원인을 『黃帝內經 痺論』³³⁾에서 “風寒濕 三氣雜至合而爲痺也”라 하여 風寒濕 外氣가 痺證의 중요한 原因이라고 언급하였고 『景岳全書』⁷⁾에서 “眞陰衰弱 精血虧損 故三氣得以乘之而爲痺”라 하였고, 『金匱要略』³⁾에서는 “歷節痛 不可屈伸 此皆飲酒汗出 當風所致”라고 하여 精氣虧虛한데 風寒濕邪가 침범해 발생하는 것으로 보고 去風除濕, 活血化癆, 通經活絡, 補肝腎의

治法을 이용하였다⁸⁾.

LPS는 동물에 각종의 실험적 자가면역질환을 유발하는 물질로, 대식세포를 자극하여 IL-1의 분비를 유발하여 T림프구 感作을 촉진시키고, 염증반응 매개물질인 TNF- α 의 분비를 유발시키며, PGE₂의 생성도 증가시켜서 일과성의 급성 관절염을 유발할 수 있으며 이 등³⁴⁾, 정 등³⁵⁾은 LPS로 관절염을 유발한 백서를 이용하여 牛膝 및 蜂毒藥鍼, 牛黃熊膽麝香 複合製劑藥鍼의 細胞性 免疫反應에 대한 효과를 보고한 바 있다⁹⁾¹¹⁾.

최근에는 遺傳子 發顯에 관한 정보를 연구하는 방법으로서 기존의 개별 遺傳子 發顯을 몇몇씩 관찰하던 방법에 비해 DNA chip을 이용함으로써 대량의 遺傳子 發顯 정보를 한꺼번에 평가하는 방법이 시도되고 있다¹²⁾³⁾.

이에 저자는 補氣, 養血, 益精하기 위해 사용되는 紫河車에 대해 藥鍼液으로서 관절염 치료활용 가능성을 살펴보고 응용범위를 넓히기 위해 紫河車 藥鍼液을 처리하였을 때 RAW 264.7 cell에 대한 遺傳子 發顯의 변화를 관찰하고자 하였다. 특히 cDNA microarray chip을 통해 대량의 遺傳子 發顯 정보를 한꺼번에 획득하여 관찰함으로써 紫河車 藥鍼液의 효과를 분자생물학적으로 이해하는 데에 유용한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

먼저 紫河車 藥鍼液을 처치했을 때 생존하는 세포의 수를 측정하기 위해 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MITT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 MITT 시험을 하였다. 紫河車 藥鍼液을 6시간 처치하고 세포 생존율을 MITT 시험으로 측정한 결과 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/ml의 紫河車 藥鍼液에서 모두 대조군에 비해 유의한 감소가 없어 본 실험에서는 紫河車 藥鍼液의 처치 농도는 3 mg/ml로 결정하였다.

유해자극으로서 1 μ g/ml LPS를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 發顯이 亢進된 遺傳子는 carboxy-terminal domain (CTD, RNA polymerase II, polypeptide A) phosphatase,

subunit 1, regulating synaptic membrane exocytosis 2 등으로 72종이 있었다.

Carboxy-terminal domain (CTD) phosphatase는 인산 가수분해 효소를 TFIIIF와 관련시키는 RNA polymerase II에서 가장 큰 단위로 세포의 다양한 전사 과정에서 중요한 역할을 한다³⁶⁾. 리보핵산의 전사 절차의 붕괴로 파생된 CTD phosphatase subunit 1 유전자는 congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome같은 상염색체 열성 유전 질환을 유발하기도 한다³⁷⁾.

Regulating synaptic membrane exocytosis 2는 cAMP-GEFII와 결합하고 플라즈마 세포막에 융합하여 cAMP-induced, Ca²⁺의존성 분비를 매개하여 cAMP가 분비세포에서의 규제된 exocytosis 뿐만 아니라 체장과 같은 exocytosis기관에서도 exocytosis하게 한다³⁸⁾.

유해자극으로서 1 µg/ml LPS를 3시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 發顯이 抑制된 遺傳子는 splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor), actinin, alpha 1 등으로 135종이 있었다.

RNA polymerase에 의해 만들어진 RNA 가닥은 세 가지의 과정을 거침으로서 완전한 mature RNA가 된다. 그 과정은 5' capping, 3' polyadenylation, splicing이다. Splicing은 유전정보를 담고 있지 않는 부분을 잘라내는 과정이다. 고등동물일수록 엄청나게 핵산의 양은 많아지지만 그만큼 유전정보를 담고 있는 않는 부분도 많다. splicing과정은 intron을 제거하고 exon을 이어 붙이는 과정이다. Subunit 4, 49kDa은 splicing factor 3b의 하나이다³⁹⁾⁴⁰⁾.

Alpha actinin은 세포골격을 구성하는 여러 spectrin gene superfamily (alpha and beta spectrins and dystrophins) 중 하나이다. Alpha actinin은 액틴과 결합된 단백질로 각기 다른 세포 type에서 다양한 역할을 가진다. Nonmuscle cells에서는 세포골격 구성은 세포막에서 액틴과 결합을 유발하는 microfilament bundles와 adherens-type

junction과 관계된다. 골격계, 심장, 근육의 구성은 myofibrillar actin filaments를 고정하는 것을 돕는 Z-disc와 analogous dense bodies에 위치하고 있다⁴¹⁾. 염증이 있을 때 세포질의 alpha actinin 1과 상호작용하여 ICAM-1을 백혈구 내벽에서 분출시키고, alpha actinin의 발현은 세포의 종양화에 관여하여 발현이 감소되면 3T3 세포를 악성 종양으로 변환시킨다⁴²⁾.

紫河車 藥鍼液을 6시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 發顯이 亢進된 遺傳子는 acrosin으로 1종이 있었으나 유의하지는 않았다. 정충에서 acrosin의 활성이 자극되면 acrosome의 반응을 유발시켜 IL-6 메카니즘을 작동시킨다⁴³⁾. 정액의 질은 정충의 acrosin의 활성도와 밀접한 관계가 있는데, 본 실험에서 紫河車 藥鍼液 처치시에 acrosin 유전자가 亢進하였는데 이는 자하거의 補精作用과 관련될 수 있으나 그 연관성에 대해 좀 더 연구가 필요하다.

紫河車 藥鍼液을 6시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 發顯이 抑制된 遺傳子는 phospholipase A2, group IB (pancreas), neurofilament, heavy polypeptide 200kDa 등으로 12종이 있었다.

Phospholipases A2는 phospholipid의 가수분해를 촉진시키는 효소로 Phospholipase A2, group IB (pancreas)는 선천면역에서 phospholipases A2의 receptor에서 neutrophil의 CXCL8을 유도함으로써 염증, 압, 면역반응에 대해 중요한 역할을 한다⁴⁴⁾.

Neurofilament, heavy polypeptide 200kDa는 amyotrophic lateral sclerosis (ALS)나 Charcot-Marie-Tooth disease (CMT)와 같은 motor neuron disease (MND)와 병리학적으로 연관이 깊다⁴⁵⁾.

유해자극으로서 1 µg/ml LPS를 3시간 처치후 紫河車 藥鍼液을 6시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 發顯이 亢進된 遺傳子는 RAB27A, member RAS oncogene family, eosinophil peroxidase 등으로 11종이 있었다.

RAB GTPases는 세포막내 수송의 조절자로 myosinVa의 보충에 필요로 한다⁴⁶⁾. Griscelli syndrome, Ashen 병에서의 RAB27A의 자연변성은 부분적으로 백피증, 면역부전을 유발한다⁴⁷⁾.

타액에서의 eosinophil peroxidase는 천식에서의 기관지 염증에 대한 중요한 척도이다. Eosinophil peroxidase는 천식에서 산화로 인한 조직손상과 관련된 eosinophils의 haem 효소로 유기물의 산화를 촉매하는 산화환원효소이다⁴⁸⁾. 혈액 또는 조직 내의 호산구의 축적은 알레르기 염증반응의 특징적인 소견으로서 호산구의 염증반응은 호산구 과립에서 분비되는 과립단백이 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다. Eosinophil peroxidase는 다양한 염증상태에서 조직의 산화에 의한 손상과 관련되어 왔다⁴⁹⁾.

유해자극으로서 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS를 3시간 처치후 紫河車 藥鍼液을 6시간 처치했을 때 vehicle을 처치한 대조군에 비해 發顯이 抑制된 遺傳子는 V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian), RW1 protein, profilin 2 등으로 16종이 있었다.

Maf군은 일반적으로 basic leucine zipper (bZip)를 가지고 있으며, large와 small Maf로 나누어진다. small Maf은 MafF, MafG, MafK로 분류되며 세포 분화과정에 관여한다⁵⁰⁾. 17q25에 위치하는 MafG는 조혈조직 유전자 표현을 조절한다⁵¹⁾.

Profilin은 3개의 유전자형을 가지며 어디에나 있는 profilin 1과는 달리 profilin 2는 신경 세포에 국한하며 dynamin 1의 활동을 조절함으로써 endocytosis를 조절할 수 있다. 또한 세포막으로부터 actin을 세포골격으로 이동하는 고리역할을 한다⁵²⁾.

LPS 처치후 發顯이 증가된 F-box protein 7, V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1 등의 遺傳子는 紫河車 藥鍼液 처치 후 發顯은 M값이 각각 2.08, 1.29에서 -0.94, -1.11 등으로 감소되었다.

F-box protein은 단백질 사이에 작용하는 대략 50개의 아미노산을 가진 단백질이다. SCF ubiquitin-

ligase complexes의 구성성분이며 최근에는 non-SCF protein complexes에서도 작용한다는 보고가 있다⁵³⁾. 그 중 F-box protein은 SCFs라 불리는 E3 ubiquitin protein ligases를 구성한다⁵⁴⁾. 본 실험에서 紫河車 藥鍼液 처치시 LPS 자극으로 發顯이 亢進되었던 F-box protein 遺傳子가 抑制되었는데 좀 더 연구가 필요하겠다.

V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1은 Yamaguchi sarcoma virus 유전자의 상동기관이나 그 외에는 다른 보고가 없었다⁵⁵⁾.

LPS 처치후 發顯이 抑制된 integral membrane protein 2B, ribosomal protein S3, 등의 遺傳子는 紫河車 藥鍼液 처치후 發顯은 M값이 각각 -1.20, -1.44에서 0.88, 0.48 등으로 亢進되었다.

Integral membrane protein 2B는 중앙세포, 신경, 뇌간, 해마, 섬유아세포에 분포하여 펩티드 가수분해 효소로 alzheimer 병, 양성종양, neurodegenerative 변화를 유발하는 것과 관련된다⁵⁶⁾.

mRNA의 codons는 리보솜에 tRNA binding을 허용하기 위하여 드러낸다. 이것은 유전 정보에 따라 성장 polypeptide 사슬로 아미노산의 합동을 이끌어 낸다. 단백질은 속하는 리보솜의 소단위에 따라 작은 것 (S1에서 S31) 및 큰 것 (L1에서 L44)으로 지명된다⁵⁷⁾. Ribosomal 단백질 S3는 작은 ribosomal 소단위 단백질의 한 개인데, 대장균에서 S3는 Met-tRNA와 바인딩한다. Ribosomal protein은 박테리아, 조류 및 식물 엽록체, cyanelle, 세균, 식물 미토콘드리아, 등뼈동물, 곤충, Caenorhabditis elegans 및 효모를 포함한다⁵⁸⁾. Ribosomal protein S3는 두 가지 기능이 있는데 하나는 전사를 시작하는 리보솜을 돕는 것이고 두 번째는 endonuclease로서 ultraviolet (UV)으로 인한 손상을 복구하는데 참여한다⁵⁹⁾.

이상의 실험에서 紫河車 藥鍼液이 다양한 유전자의 發顯을 향진 또는 억제함을 알 수 있었으나 관절염의 치료 작용과 관련된 유전자에 대한 심도 있는 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

紫河車 藥鍼液의 LPS 유도 관절염에 대한 영향을 확인하기 위해 microarray를 통해 대량의 遺傳子 發顯 정보를 분석하여 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 유해자극으로서 LPS를 처치했을 때 대조군에 비해 發顯이 亢進된 遺傳子는 CTD phosphatase, subunit 1, regulating synaptic membrane exocytosis 2 등 72종이 있었다.
2. 유해자극으로서 LPS 처치했을 때 대조군에 비해 發顯이 抑制된 遺傳子는 splicing factor, arginine /serine-rich 1, actinin alpha 1 등 135종이 있었다.
3. 紫河車 藥鍼液을 처치했을 때 대조군에 비해 發顯이 亢進된 遺傳子는 acrosin으로 1종이 있었으나 유의하지는 않았다.
4. 紫河車 藥鍼液을 처치했을 때 대조군에 비해 發顯이 抑制된 遺傳子는 phospholipase A2, group IB (pancreas), neurofilament, heavy polypeptide 200kDa 등 12종이 있었다.
5. LPS 처치후 紫河車 藥鍼液을 처치했을 때 대조군에 비해 發顯이 亢進된 遺傳子는 RAB27A, member RAS oncogene family, eosinophil peroxidase, a disintegrin and metalloproteinase domain 17 등 11종이 있었다.
6. LPS 처치후 紫河車 藥鍼液을 처치했을 때 대조군에 비해 發顯이 抑制된 遺傳子는 V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian), RW1 protein, profilin 2 등 16종이 있었다.
7. LPS 처치후 發顯이 증가된 F-box protein 7, V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1의 遺傳子는 紫河車 藥鍼液 처치후 M값이 각각 2.08, 1.29에서 -0.94, -1.11 등으로 減少되었다.
8. LPS 처치후 發顯이 抑制된 integral membrane protein 2B, ribosomal protein S3 등의 遺傳子는 紫河車 藥鍼液 처치후 M값이 각각 -1.20, -1.44에서 0.88, 0.48 등으로 亢進되었다.

참 고 문 헌

1. 동경 여자의과대학 부속 교원병·류마티스 통풍 센터 편. 류마티스 진료서. 서울:군자출판사. 2000:25-9.
2. 윤지희. Immune Responses in Rheumatoid Arthritis. 분자세포생물학뉴스. 2002;14(4):7-12.
3. 金楨汎. 金匱要略辨釋(上). 서울:韓醫文化社. 2000:142-3.
4. 金定濟. 診療要鑑. 서울:東洋醫學研究所. 1974:459-60.
5. 顧伯華. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:385-9.
6. 권재식, 김기현, 김형태, 박응호, 서성훈. 痺證. 서울: 정담. 1993: 29, 208-10, 214.
7. 張介賓. 景岳全書. 北京:人民衛生出版社. 1991:248-55.
8. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 台北:昭人出版社. 1974:19.
9. 오찬호 譯. 신 번역학입문. 서울:지구문화사. 1995: 118-23.
10. Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T, Takagi K, Yoshinaga M. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. Clin Exp Immunol. 1993;93(2):206-11.

11. Noyori K, Okamoto R, Takagi T, Hyodo A, Suzuki K, Koshino T. Experimental induction of arthritis in rats immunized with Escherichia coli 0:14 lipopolysaccharide. *J Rheumatol.* 1994; 21(3):484-8.
12. Wilgenbus KK, Lichter P. DNA chip technology ante portas. *J Mol Med.* 1999;77(11):761-8.
13. Sapolsky RJ, Lipshutz RJ. Mapping genomic library clones using oligonucleotide arrays. *Genomics.* 1996;33(3):445-56.
14. 한상원, 서정철, 이윤호, 최재용. 鹿茸藥鍼液의 DNA chip을 이용한 遺傳子 發顯 分析. *대한침구학회지.* 2003;20(3):34-44.
15. 이경민, 임성철, 정태영, 서정철, 한상원. Oligonucleotide chip을 이용한 紅花子藥鍼液이 肝癌細胞柱의 遺傳子 發顯에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2005;22(3):215-25.
16. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울:圖書出版永林社. 1994:567-8.
17. 이채우. 紫河車 藥鍼의 口眼喎斜에 대한 臨床的 研究. 동의대학교 대학원 석사학위논문. 2005.
18. 권강, 정재호, 서형식. 紫河車 약침치료를 이용한 양측 동시성 Bell's palsy 환자 1례에 대한 증례보고. *대한약침학회지.* 2003;6(2):137-47.
19. 윤정훈, 육태한, 송범룡. 紫河車藥鍼의 Bell's palsy에 대한 治驗報告. *대한약침학회지.* 2000;3(1):89-99.
20. 윤현민, 이채우, 김홍기. 紫河車 약침이 수면장애에 미치는 효과. *대한약침학회지.* 2005;8(1):5-12.
21. 김은근, 박영엽, 이광호, 이한배, 장성익, 김성균, 심윤섭, 이정희. 자하거 약침 투여후 기침 가래 증상이 호전된 폐렴 후유증 환자 2례. *대한약침학회지.* 2003;6(3):65-73.
22. 임지택. 자하거 약침이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 석사학위논문. 2005.
23. 육태한, 이창현, 이학인. 홍화자농축자하거 약침이 골다공증에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2001;18(1):61-75.
24. Jea-Yeun Lim, Dong-Il Kim, Tae-Kyun Lee. A Study on Bone Resorption & Osteoporosis by Honghwain-Jahage extracts. *大韓韓方婦人科學會誌.* 2003;16(1):101-17.
25. 최창우. 자하거 가수분해물이 5-Fluorouracil 매개성 골수부전 개선에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 박사학위논문. 2003.
26. 이순이, 이철웅, 김진우, 조진형. 産後 憂鬱症을 紫河車 藥鍼을 활용하여 治療한 1例. *大韓韓方婦人科學會誌.* 2006;19(2):282-94.
27. 장소영, 김현중, 이동열, 이은용. 자하거 약침의 월경통에 대한 효과. *대한침구학회지.* 2005;22(6):85-92.
28. 최석우, 박민호, 임성택. 봉약침과 자하거약침 시술로 호전된 횡단성척수염 환자에 대한 임상적 고찰. *대한약침학회지.* 2005;8(2):17-22.
29. 엄미정, 강지은, 함대현, 박희준, 이은주, 심인섭, 이희정. 흰쥐의 Adjuvant 관절염에 대한 자하거(紫河車) 약침의 효과. *대한약침학회지.* 2002;5(1):91-103.
30. Hong X, Li Y, Hussain M, Sarkar FH. Gene expression profiling reveals novel targets of estramustine phosphate in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 2004;209(2):187-95.
31. 한창환, 김형관, 김원유, 이광원, 엄의용, 김정만. 류마티오이드 관절염 활액막에서의 p53 중앙 억제 유전자 변이. *대한정형외과학회지.* 2001;36(1):9-15.
32. 박지희, 심영식, 선두훈, 조철수, 김호연, 이숙경. 류마티스 관절염 환자의 활막 세포에서 TNF- α 에 의한 TRAF 유전자들의 발현 변화. *Korea J Immunol.* 2000;22(3):139-48.
33. 王琦. 黃帝內經素問今釋. 서울:成輔社. 1983:206, 209.
34. 이승덕, 김갑성. 牛膝 및 蜂毒藥鍼이 생쥐의 LPS 誘發關節炎의 細胞性免疫反應에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌.* 1999;16(3):287-315.
35. 정경연, 김갑성, 윤종화. 牛黃熊膽麝香 複合製劑 藥鍼刺戟이 LPS 誘發關節炎의 免疫反應에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌.* 2001;18(1):113-28.
36. Jeong SJ, Kim HJ, Yang YJ, Seol JH, Jung BY, Han JW, Lee HW, Cho EJ. Role of RNA polymerase II carboxy terminal domain phosphorylation in DNA damage response. *J Microbiol.* 2005;43(6):516-22.

37. Kalaydjieva L. Congenital cataracts-facial dysmorphism- neuropathy. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:32.
38. Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2000;2(11):805-11.
39. Champion-Arnaud P, Reed R. The prespliceosome components SAP 49 and SAP 145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site. *Genes.* 1994;8(16):1974-83.
40. Warner DR, Roberts EA, Greene RM, Pisano MM. Identification of novel Smad binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(4):1185-90.
41. Youssoufian H, McAfee M, Kwiatkowski D. J. Cloning and chromosomal localization of the human cytoskeletal alpha-actinin gene reveals linkage to the beta-spectrin gene. *Am J Hum Genet.* 1990;47:62-72.
42. Celli L, Ryckewaert JJ, Delachanal E, Duperray A. Evidence of a functional role for interaction between ICAM-1 and nonmuscle alpha-actinins in leukocyte diapedesis. *J Immunol.* 2006; 177(6):4113-21.
43. Zi J, Song P. *Zhonghua Nan Ke Xue.* Mechanism of IL-6 on acrosome reaction in human sperm. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2006;12(6):528-30.
44. Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G, Laine VJ. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(7):745-56.
45. Garcia ML, Singleton AB, Hernandez D, Ward CM, Evey C, Sapp PA, Hardy J, Brown RH Jr, Cleveland DW. Mutations in neurofilament genes are not a significant primary cause of non-SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2006;21(1):102-9.
46. Alistair N. Hume, Lucy M. Collinson, Andrzej Rapak, Anita Q. Gomes, Colin R. Hopkins, and Miguel C. Seabra. Rab27a Regulates the Peripheral Distribution of Melanosomes in Melanocytes. *J Cell Biol.* 2001;152(4):795-808.
47. Kazuo Kasai, Mica Ohara-Imaizumi, Noriko Takahashi, Shin Mizutani, Shengli Zhao, Toshiteru Kikuta, Haruo Kasai, Shinya Nagamatsu. Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J Clin Invest.* 2005;115(2):388-96.
48. Christine J. van Dalen, Christine C. Winterbourn, and Anthony J. Kettle. Mechanism of nitrite oxidation by eosinophil peroxidase: implications for oxidant production and nitration by eosinophils. *Biochem J.* 2006;394(3):707-13.
49. Venge P. Eosinophil and neutrophil granulocytes. *Allergy* 1993;48:39-47.
50. Iwata T, Kogame K, Toki T, Yokoyama M, Yamamoto M, Ito E. Structure and chromosome mapping of the human small maf-genes MAFG and MAFK. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;82(1-2):88-90.
51. Blank V, Knoll JH, Andrews NC. Molecular characterization and localization of the human MAFG gene. *Genomics.* 1997; 44(1):147-9.
52. Gieselmann, R. Kwiatkowski, D. J. Janmey, P. A. Witke, W. Distinct biochemical characteristics of the two human profilin isoforms. *Europ. J. Biochem.* 1995;229:621-8.
53. Kipreos ET, Pagano M. The F-box protein family. *Genome Biol.* 2000;1(5):REVIEWS3002.
54. Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr Biol.* 1999;9(20):1177-9.
55. Semba K, Yamanashi Y, Nishizawa M, Sukegawa J, Yoshida M, Sasaki M, Yamamoto T, Toyoshima K. Location of the c-yes gene on the human chromosome and its expression in

- various tissues. *Science*. 1985;227:1038-40.
56. Ghiso J, Rostagno A, Tomidokoro Y, Lashley T, Bojsen-Moller M, Braendgaard H, Plant G, Holton J, Lal R, Revesz T, Frangione B. Genetic alterations of the BRI2 gene: familial British and Danish dementias. *Brain Pathol*. 2006;16(1):71-9.
57. Ramakrishnan V, Moore PB Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(2):144-54.
58. Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*. 1994;265(5172):615-21.
59. Tycowski KT, Shu MD, Steitz JA. A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3. *Genes Dev*. 1993;7:1176-90.