

흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 석창포(*石菖蒲* *Acori graminei rhizoma*, AGR)에 의한 유전자 표현 변화의 microarray 분석

박동준 · 정승현 · 문일수¹ · 이원철 · 신길조*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, ¹동국대학교 의과대학 해부학교실

Received December 12, 2006 / Accepted January 10, 2007

Microarray Analysis of Alteration in Gene Expression by *Acori graminei rhizoma* (AGR) Water-Extract in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Dong-Jun Park, Seung-Hyun Jung, Il-Soo Moon¹, Won-Chol Lee and Gil-Jo Shin*. *Dept. of Oriental Medicine, and ¹Department of Anatomy, Dongguk University* – *Acori graminei Rhizoma* (AGR) is a perennial herb which has been used clinically as a traditional oriental medicine against stroke, Alzheimer's disease, and vascular dementia. We investigated the effect of AGR on the modulation of gene expression profile in a hypoxic model of cultured rat cortical cells. Rat cerebrocortical cells were grown in Neurobasal medium. On DIV12, cells were treated with AGR (10 ug/ml), given a hypoxic shock (2% O₂, 3 hr) on DIV14, and total RNAs were prepared one day after shock. Microarray analyses indicated that the expression levels of most genes were altered within the global M values +0.5 and -0.5, i.e., 40% increase or decrease. There were 750 genes which were upregulated by < global M +0.2, while 700 genes were downregulated by > global M -0.2. The overall profile of gene expression suggests that AGR suppresses apoptosis (upregulation of anti-apoptotic genes such as TEGT, TIEG, Dad, p53, and downregulation of pro-apoptotic genes such as DAPK, caspase 2, pcdc8), ROS (upregulation of RARα, AhR), and that AGR has neurotrophic effects (upregulation of Akt1, Akt2). These results provide a platform for investigation of the molecular mechanism of the effect of AGR in neuroprotection.

Key words – *Acori graminei Rhizoma*, rat cortical cell culture, hypoxia, microarray

서론

뇌세포는 세포 생존을 위하여 혈액 순환에 의한 지속적인 영양과 산소의 공급을 필요로 한다. 임상에서 뇌세포는 뇌허혈 및 심정지 등으로 인한 심박출량 감소, 폐질환 및 이산화탄소 중독 등으로 인한 혈중 산소분압의 저하 등에 의해 저산소증 상태에 빠지게 된다. 일시적인 저산소·허혈 상태는 비가역적인 뇌신경 세포사를 유발하며 이는 세포사의 주 기전인 necrosis 또는 apoptosis에 의하게 된다[4]. 그러나 저산소·허혈성 뇌병증의 병태생리 기전의 다인성과 복잡성, 임상 실험의 한계 등으로 뇌손상 기전의 많은 부분이 알려져 있지 않다[34]. 다만 에너지 준위의 저하(energy failure), 자유기에 의한 손상, cytokine과 흥분성 세포독성의 작용, caspase dependent cell death 등의 기전이 제시되고 있다[3,36,37].

최근에는 많은 동물 실험 모델에서 저산소증에 의한 신경 세포사가 저산소 상태 단독으로 apoptosis가 유발될 수 있으며 이는 유전자적 변화에 기인함이 알려지고 있다[2,42]. Apoptosis는 유전자에 의해 조절되는 프로그램화된 과정(gene-directed process)으로[44] 지연성 신경세포사(delayed

neuronal death)의 주 기전이다. 따라서 저산소증 상태 또는 약물처리의 유전자 발현 변화를 관찰하여 apoptosis의 기전을 이해하면 치료에 대한 접근이 될 것으로 기대된다.

석창포(*石菖蒲*, *Acori graminei Solander*)는 천남성과(Araceae) 창포속(*Acorus*)에 속하는 늘푸른 여러해살이 풀이다. *Acorus gramineus Soland*의 뿌리줄기인 생약재 석창포(*Acori graminei Rhizoma*, AGR)는 신고온(辛苦溫)하고 개심구(開心孔), 보오장(補五臟), 통구균(通九竅), 명이목(明耳目), 출음성(出音聲)[55]하여 개구할담(開竅豁痰), 성신익지(醒神益智), 화습개위(化濕開胃)하는 효능을 갖고 있다[56]. 풍한습비(風寒濕痺), 해역상기(咳逆上氣), 금구하리(噤口下痢), 광란전근(霍亂轉筋)을 치료하며 지황음자(地黃飲子), 청심온담탕(淸心溫膽湯)이 대표적 처방이다. AGR에 대한 실험적 연구로는鄭 등[25]의 국소 뇌혈류량 및 혈압에 미치는 효과 및 기전, 金 등[29]의 흰쥐 뇌허혈의 신경 방어효과 보고가 있다. 또한 저산소증을 유발한 배양한 대뇌신경세포에서 AGR의 세포사 방지에 대한 보고[48]에서 AGR가 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성을 줄이며 mitochondria의 막전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 유지시키는 것으로 알려졌다. 이처럼 AGR은 가장 잘 알려진 전통의학 제제로서 흔히 심혈관증상(cardiovascular symptom)에 처방되어, 중풍(stroke), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 그리고 혈관성 치매(vascular dementia) 등의 치료에 이용되고 있

*Corresponding author

Tel : +82-31-710-3710, Fax : +82-31-710-3780

E-mail : Shingcho@naver.com

다. 특히 AGR은 다른 생약제와 혼합물로서 증풍을 치료하는 주된 약제 가운데 하나이다. AGR에는 휘발성 기름(정유, 精油)을 함유하는데 주로 α -asarone(8.8–13.7%) 및 β -asarone(63.2–81.2%)으로 구성된다[9]. AGR와 그 주성분인 asarone은 흥분성신경세포사(excitotoxic neural death)에 대한 신경보호작용이 있음이 밝혀졌다[11,12] 또한 AGR은 인지기능향상 및 허혈에 의한 해마CA1신경세포의 손실을 방지하는 효능을 보였다[24]. 이러한 연구결과들은 AGR이 허혈/저산소증에서 신경세포를 보호하고 인지기능의 향상효능이 있음을 의미한다.

특정 상황에서 유전자들의 표현 증감은 어떤 세포가 그 상황에 어떻게 대처하는지에 대한 지식을 제공한다. 유전자를 분석하는 기술의 하나인 DNA microarray는 mRNA가 glass 표면에 고정된 유전자에 결합하는 정도를 측정함으로써 유전자표현의 수준을 알 수 있게 하는데, 이때 수천 혹은 수만 개의 유전자를 glass 표면에 고정시킴으로써(따라서 DNA chip으로 불림) 많은 유전자의 표현정도를 동시에 측정할 수 있다[40,43,49]. microarray는 유전자, 세포, 조직의 기능에 대한 정보를 제공하며 뇌와 신경계 같은 복잡한 조직의 유전자 발현 분석에 사용되고 있다[13,14,50,51]. 본 연구에서는 저산소증을 유발한 흰쥐 대뇌신경세포에 AGR을 처리하여 유전자 표현 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

약제

실험에 사용된 생약제 석창포(*Acori graminei rhizoma*. AGR)는 창포(*Acori graminei Solander*)의 뿌리줄기로서 대한약전 및 대한약전 외 한약 규격주해[18]에 근거하여 동국대학교 부속 한방병원에서 구입하였다.

석창포의 물추출액 제조

AGR(2 g)에 20 ml의 증류수를 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 진탕하였다. 이를 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45 μ m)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의량은 1 ml 추출액 3 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18 : E₁₈)의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌피질신경세포를 Brewer 등[21]의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E₁₈의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES (pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Invitrogen Life Technology) 5 ml

로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml Hank's 용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정된 다음 약 1,500 cells/mm² 되도록 B27을 첨가한 plating neurobasal media (Invitrogen Life Technology)(100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25mM glutamate, 0.1 ml 25 mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding neurobasal media(100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

저산소증 유발

Culture plate를 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂ 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

RNA 추출

RNA 추출을 위한 배양은 60 mm dish를 사용하였다. DIV12에 AGR 10 μ g/ml를 처리하고 DIV14에 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나고 24 시간 후에 배양액을 제거하고 5~10 ml의 ice-cold PBS로 수세하였다. PBS를 제거하고 용액D[4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate-2H₂O, 0.5% (w/v) sodium lauryl sarcosinate, 0.1 M β -mercaptoethanol] 1 ml를 각 culture dish에 넣어 세포를 용해시켰다. 용해된 lysate를 microfuge tube에 옮기고 tissue homogenizer로 15~30초간 균질화하였다. 여기에 용액D 1 ml 당 0.1 ml의 2 M sodium acetate(pH4.0), 1 ml의 phenol(4°C), 0.2 ml의 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 잘 섞어주었다. 튜브를 얼음에 15분간 넣어둔 후 원심분리(10,000 x g, 20분, 4°C)하여 상등액을 취하고 동일부피의 isopropanol을 넣어 잘 섞어주었다. 이를 -20°C에서 2시간 처리한 후 원심분리하여(10,000 x g, 30분, 4°C) RNA를 침전시키고 용액D로 녹였다. 이를 isopropanol로 한 번 더 침전시킨 후 75% alcohol로 2회 수세한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리한 물에 녹이고 -70°C에 보관하였다.

Microarray

Microarray는 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 분석하였다. 대조군과 실험군의 저산소증 유발 세포에서 각각 분리한 20~50 μ g의 total RNA로부터 oligo(dT) primer와 역전사 효소를 이용하여 first cDNA strand를 만들고, 대조군은 Cy3 dye(green)로, 실험군은 Cy5 dye(red)로 표지하였다. 두 probe를 1:1 혼합하여 TwinChipTM Rat-5K(Digital Genomics)을 hybridization (3X SSC, 42°C, 16시간)하고 최종적으로 0.1X SSC

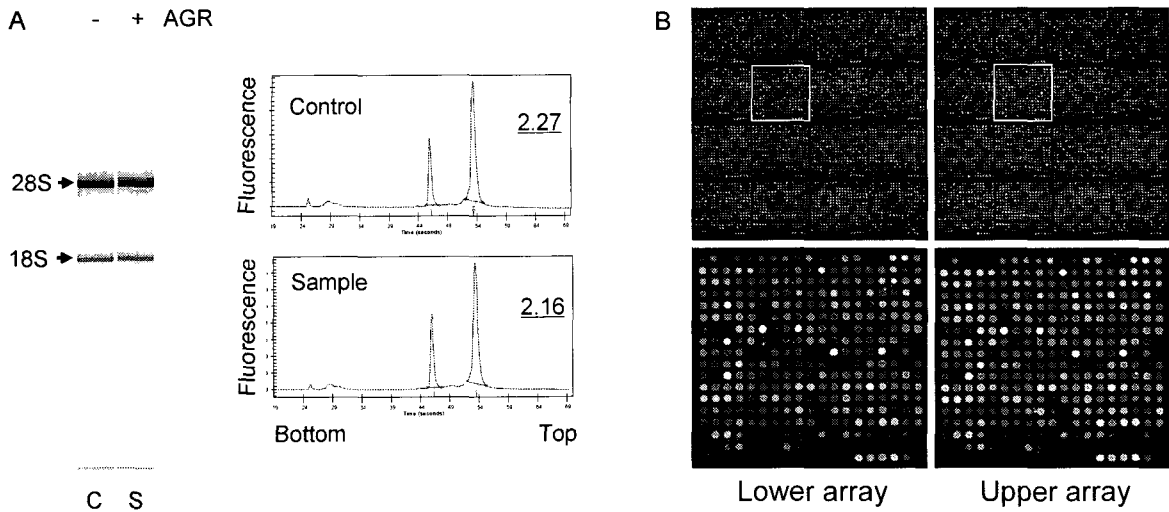


Fig. 1. Quality of isolated total RNA and pseudocolor fluorescence image maps. A, Total RNA was isolated from AGR-treated (AGR +) and -untreated (AGR -) cortical culture at 24 hrs after hypoxic insult, electrophoresed (left panels), and scanned at A₂₆₀ (right panels) using a Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). Underlined numbers in the right panels indicate 28S rRNA/18S rRNA ratio. B, Pseudocolor image maps. The control cDNA (AGR-untreated culture) and sample cDNA (AGR-treated culture) were labeled with Cy3 (green) and Cy5 (red) fluor, respectively. Images of the upper array and lower array of the TwinChip™ Rat-5K microarray chip (Digital Genomics, Seoul) are shown. One block from each arrays is shown enlarged (bottom images).

로 상온에서 1분씩 4회 세척하였다. 디지털형광이미지는 ScanArray Lite microarray analysis system(Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston, MA, USA)을 이용하여 얻었다.

결 과

저산소증에서 AGR에 의한 유전자표현 변화의 개요

저산소증에서 AGR의 신경세포 보호 기전을 알아보기 위하여 microarray 기법으로 AGR가 유전자 표현에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에 사용한 흰쥐 대뇌신경세포는 저산소증 유발 후 1일에는 거의 영향을 받지 않다가 3일 후부터 급격히 사망하기 시작한다. 따라서 저산소증 유발 후 1일 경에는 많은 유전자의 표현이 달라질 것으로 예상되어, 본 실험에서는 DIV12의 배양세포에 AGR 10 ug/ml를 처리하고 DIV14에 저산소증을 유발하였으며, DIV15에 세포로부터 guanidinium thiocyanate 방법으로 total RNA를 분리하였다 (Fig. 1). 분리한 total RNA를 capillary electrophoresis로 전기영동하고(Fig. 1A, left panel) scan하여(BioAnalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, California) RNA 품질을 조사한 결과 대조군과 실험군 모두 RNA 분해가 거의 일어나지 않았으며, rRNA ratio(28S/18S)가 2.0 이상으로 매우 좋은 상태를 확인할 수 있었다(Fig. 1A, right panels).

Microarray 전문회사인 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 TwinChip™ Rat-5K microarray chip을 형광사진으로 분석하였다. 대조군의 cDNA는 Cy3 형광물질(green)로, 실험군은 Cy5 형광물질(red)로 표지하였다. TwinChip의 upper

array와 lower array의 형광이미지가 매우 유사하여 재현성이 높음을 알 수 있었다(Fig. 1B). MA plot에서 보면 $M = \log_2(R/G)$, $A = \{\log_2(R \times G)\}/2$, 대부분의 M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 정도 이내의 증감을 나타내었다(Fig. 2).

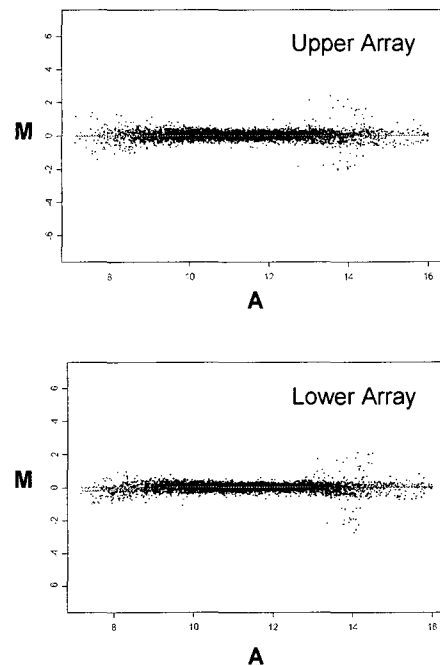


Fig. 2. The MA plots. The y-axis indicate the R/G ratio $[M = \log_2(R/G)]$ and the x-axis signal intensities $[A = \{\log_2(R \times G)\}/2]$. Note that the M values of the majority of signals are between -0.5 and +0.5.

이 가운데 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가된 유전자는 750여 중, -0.2 이하 즉, 14% 이상 표현이 감소된 유전자는 700여 종이였다.

Apoptosis 관련 유전자 표현 변화

저산소증에서 AGR에 의하여 apoptosis 관련 유전자 중 Global M 값이 ±0.2 이상 즉, ±14% 이상 표현이 증감된 유전자는 13종류로, 그 중 7종류는 표현이 증가되었고, 6종류는 감소되었다(Table 1). 표현이 증가한 유전자 중 testis-enhanced gene transcript (TEGT)가 가장 많이 증가하였다(Global M = 0.43). 다른 증가한 유전자로는 Retinoic acid receptor alpha(RARα, Global M = 0.36), aryl hydrocarbon receptor(AhR, Global M = 0.35), transforming growth factor-β (TGFβ)-inducible early response gene (TIEG, Global M = 0.32), defender against death(Dad, Global M = 0.27), tumor protein p53(Global M = 0.24), 그리고 Akt1(Global M = 0.22) 등이 있었다. 반면에 AGR에 의하여 Global M 값이 0.2 이상으로 표현이 감소되는 유전자 중 가장 많이 감소된 유전자는 death-associated protein kinase (DAPK)로 나타났다(Global M = 0.55). 이 밖에도 caspase 2, programmed cell death 8(pcd8) 유전자의 표현이 감소하였다(각각 Global M= 0.26 및 0.28).

세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 표현 변화

저산소증에서 AGR에 의하여 세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 중 57종류의 표현이 Global M 값이 0.2 이상으로 증가하였다(Table 2). 이 가운데 murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog 2(Akt2)가 거의 2배 증가하였다(Global M = 0.93). 한편 Global M 값이 -0.2 이상으로 감소한 유전자는 51종류가 있었다(Table 3).

세포주기 관련 유전자 표현 변화

저산소증에서 AGR에 의하여 세포주기 관련 유전자 중 11

종류의 표현이 증가되었으며 6종류는 감소되었다(Table 4). 이 중 Akt2가 가장 많이 증가되었다(Global M = 0.62).

스트레스 반응 관련 유전자 표현 변화

저산소증에서 AGR에 의하여 9종류의 스트레스 반응 관련 유전자는 표현이 증가되었으며 16종류는 감소되었다(Table 5).

신호전달 관련 유전자 표현 변화

저산소증에서 AGR에 의하여 신호전달 관련 유전자 중 25종류는 표현이 증가되었으며(Table VI), 26종류는 감소되었다(Table 6).

Transcription 관련 유전자 표현 변화

저산소증에서 AGR에 의하여 transcription 관련 유전자 중 15종류는 표현이 증가되었으며, 6종류는 감소되었다(Table 7).

고 찰

中風(Stroke)은 중추신경계의 허혈, 저산소 및 출혈로 인한 뇌신경세포 손상으로 발생하며 사망 또는 편마비 등의 신체적 장애를 야기한다[30]. 뇌신경세포는 손상 이후 재생이 불가능하여 치료가 매우 어려우므로 뇌신경 손상 이후의 세포 사멸을 방지하기 위한 연구들이 이루어지고 있다. 뇌신경 세포의 손상, 사망은 손상 중심부에서 일어나는 세포괴사(necrosis)와 손상 주변부(penumbra)에서 일어나는 세포자연사(apoptosis) 기전으로 진행되는 것으로 알려져 있다[21,54]. 일시적인 저산소·허혈 상태는 비가역적인 뇌신경 세포사를 유발하나 [4] 저산소·허혈성 뇌병증의 병태생리 기전의 다인성과 복잡성, 임상 실험의 한계 등으로 뇌손상 기전의 많은 부분이 알려져 있지 않다[34].

Table 1. Apoptosis-related genes

global.M	Gene	Title
0.4338253	Tegt	testis enhanced gene transcript
0.359192	Rara	retinoic acid receptor, alpha
0.3495265	Ahr	aryl hydrocarbon receptor
0.3150939	Tieg	TGFβ inducible early growth response
0.2655959	Dad1	defender against cell death 1
0.2400137	Tp53	tumor protein p53
0.2177921	Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
-0.263935	Casp2	caspase 2
-0.275249	Pdcd8	programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
-0.299456	Bcl2l1	Bcl2-like 1
-0.316919	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
-0.327584	P2rx1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
-0.554658	Dapkl	Death-associated like kinase

Table 2. Growth & maintenance-related upregulated genes

global.M	Gene	Title
0.933875	Akt2	murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog 2
0.632714	Fmo1	flavin containing monooxygenase 1
0.600255	Pim3	serine threonine kinase pim3
0.559174	Slc29a1	solute carrier family 29, member 1
0.531662	Vdp	vesicle docking protein, 115 kDa
0.507748	Syt1	synaptotagmin 1
0.4977	Arl2	ADP-ribosylation-like 2
0.452128	Cspg6	chondroitin sulfate proteoglycan 6
0.440181	Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide
0.405393	Parva	parvin, alpha
0.394642	Gabrd	gamma-aminobutyric acid A receptor, delta
0.370954	Slc22a1	solute carrier family 22, member 1
0.352746	Csrp1	cysteine and glycine-rich protein 1
0.349527	Ahr	aryl hydrocarbon receptor
0.346913	Stx5a	syntaxin 5a
0.342084	CHOT1	choline transporter
0.339883	Myo5b	myosin 5B
0.336225	Syt5	synaptotagmin 5
0.331406	Cacnb3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
0.315094	Tieg	TGFB inducible early growth response
0.307668	H1ft	germinal histone H4 gene
0.303681	Mapk1	mitogen activated protein kinase 1
0.301254	Napa	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein alpha
0.298449	Psmc4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase,4
0.290101	Rab14	GTPase Rab14
0.285272	Igfbp6	insulin-like growth factor binding protein 6
0.281387	Ins2	insulin 2
0.276562	Slc2a2	solute carrier family 2, member 2
0.276217	Atp5e	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit
0.274778	Calm3	calmodulin 3
0.271141	Cdkn1b	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
0.266428	Apoe	apolipoprotein E
0.265573	Slc7a1	solute carrier family 7, member 1
0.263534	Slc11a2	solute carrier family 11 member 2
0.260795	Cacna1a	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1A subunit
0.256203	Cdc42bpb	Cdc42-binding protein kinase beta
0.252564	Rab4a	RAB4A, member RAS oncogene family
0.247105	Ptp2E	protein tyrosine phosphatase 2E
0.243259	Stk12	serine/threonine kinase 12
0.240014	Tp53	tumor protein p53
0.23979	Syp	synaptophysin
0.236584	Rbp1	retinol binding protein 1
0.232354	Nras	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
0.231941	D123	D123 gene product
0.227788	Ctnnb	cortactin isoform B
0.226114	Dncic2	dynein, cytoplasmic, intermediate polypeptide 2
0.224386	Slc21a5	solute carrier family 21 (organic anion transporter), member 5
0.222698	Vegf	vascular endothelial growth factor
0.221664	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3
0.220468	Tubb5	tubulin, beta 5
0.217792	Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
0.217454	Kcnj11	potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11
0.212975	Hap1	huntingtin-associated protein 1
0.212862	Slc12a3	solute carrier family 12, member 3
0.208636	Dbi	diazepam binding inhibitor
0.203466	Atp1b3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3 polypeptide
0.200021	Gc	group specific component

Table 3. Growth & maintenance-related downregulated genes

global.M	Gene	Title
-1.120203	Gap43	growth associated protein 43
-0.608563	Scn1b	sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide
-0.596526	Waspip	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein
-0.589302	Nup98	nucleoporin 98
-0.563218	Cd5	CD5 antigen
-0.554263	P2rx7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
-0.527429	Alb	albumin
-0.507394	Dyrk1a	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A
-0.492302	Atp2c1	ATPase, Ca ⁺⁺ -sequestering
-0.463094	Star	steroidogenic acute regulatory protein
-0.454078	Arf1	ADP-ribosylation factor 1
-0.452376	Rps29	ribosomal protein S29
-0.434359	Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3
-0.433277	Myo1e	myosin IE
-0.420183	Cdk4	cyclin-dependent kinase 4
-0.412395	Slc7a9	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 9
-0.402488	Vps33b	vacuolar protein sorting homolog r-vps33b
-0.383941	Timm44	translocator of inner mitochondrial membrane 44
-0.374222	Eif2ak1	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1
-0.360927	Cdk5	cyclin-dependent kinase 5
-0.359943	Itpr2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2
-0.353422	Rab10	ras-related protein rab10
-0.346455	Slc2a3	solute carrier family 2, member 2
-0.34144	Dnm1	dynamamin 1
-0.327584	P2rx1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
-0.323059	Apoc3	apolipoprotein C-III
-0.321754	Fxyd1	FXFD domain-containing ion transport regulator 1
-0.315732	Igf2	insulin-like growth factor 2
-0.281111	Itpr3	inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 3
-0.278889	Pxmp3	peroxisomal membrane protein 3
-0.277821	Scnn1a	sodium channel, nonvoltage-gated, type I, alpha polypeptide
-0.275249	Pdcd8	programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
-0.268365	Slc3a1	solute carrier family 3, member 1
-0.262467	Aqp9	aquaporin 9
-0.25747	Apba3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3 (X11-like 2)
-0.254749	Atp5j	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6
-0.252214	Fabp3	fatty acid binding protein 3
-0.248841	Ptgds	prostaglandin D2 synthase
-0.248009	Mpst	mercaptopyruvate sulfurtransferase
-0.243243	Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
-0.234299	Atp1a1	ATPase, Na ⁺ K ⁺ transporting, alpha 1
-0.228387	Apod	apolipoprotein D
-0.226378	Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3
-0.220701	Xpo1	exportin 1 (CRM1, yeast, homolog)
-0.217966	Parva	parvin, alpha
-0.217798	Alb	albumin
-0.21424	Rps5	ribosomal protein S5
-0.211961	Ywhag	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide
-0.211112	Slc1a1	solute carrier family 1, member 1
-0.21111	Pdgfa	platelet derived growth factor, alpha
-0.204514	Epn2	EH domain binding protein epsin 2

뇌허혈이 수 분간만 지속되어도 신경세포는 저산소와 포도당 결핍으로 ATP 대사장애가 발생하여 허혈 손상으로 취약한 부위에 선택적이고 심한 손상이 유발된다. 이는 즉각적으로 발생하지 않고 수 시간에서 수 일에 걸쳐 지연성으로

일어나며 이러한 세포사의 과정을 지연성 신경세포사 (delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사의 주요한 기전의 하나가 apoptosis이다[28,31,32]. 하지만 짧은 시간이라도 심각한 산소 고갈 상태는 뇌세포의 necrosis를

Table 4. Cell cycle-related genes

global.M	Gene	Title
0.933875	Akt2	murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog 2
0.452128	Cspg6	chondroitin sulfate proteoglycan 6
0.349527	Ahr	aryl hydrocarbon receptor
0.303681	Mapk1	mitogen activated protein kinase 1
0.274778	Calm3	calmodulin 3
0.271141	Cdkn1b	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
0.243259	Stk12	serine/threonine kinase 12
0.240014	Tp53	tumor protein p53
0.232354	Nras	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
0.231941	D123	D123 gene product
0.221664	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3
-0.42018	Cdk4	cyclin-dependent kinase 4
-0.36093	Cdk5	cyclin-dependent kinase 5
-0.31573	Igf2	insulin-like growth factor 2
-0.27525	Pdcd8	programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
-0.22638	Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3
-0.21111	Pdgfa	platelet derived growth factor, alpha

Table 5. 'Response to stress'-related genes

global.M	Gene	Title
0.5806365	Cryab	crystallin, alpha B
0.4569663	Tcrp	T-cell receptor gamma chain
0.4521283	Cspg6	chondroitin sulfate proteoglycan 6
0.3495265	Ahr	aryl hydrocarbon receptor
0.3134656	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
0.3024587	Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase
0.2627271	C4bpb	complement component 4 binding protein, beta
0.2400137	Tp53	tumor protein p53
0.2079885	Ddt	D-dopachrome tautomerase
-0.47317	A2m	alpha-2-macroglobulin
-0.456714	Gng7	guanine nucleotide binding protein, gamma 7
-0.411808	Fn1	fibronectin 1
-0.376484	Prkag1	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
-0.374222	Eif2ak1	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1
-0.355189	C8b	complement component 8, beta polypeptide
-0.32194	B2m	beta-2 microglobulin
-0.319142	Txnrd2	thioredoxin reductase 2
-0.312491	Fancc	Fanconi anemia, complementation group C
-0.299456	Bcl2l1	Bcl2-like 1
-0.24972	Trip10	thyroid hormone receptor interactor 10
-0.247403	Mgmt	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
-0.244005	Cat	catalase
-0.238325	Epo	erythropoietin
-0.220701	Xpo1	exportin 1 (CRM1, yeast, homolog)
-0.215051	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5

유발할 수도 있다[16]. 인체의 신경세포는 무산소증에 가장 민감한(anoxia-sensitive) 세포로 여겨져 왔으나 최근 산소부족 상태에서의 신경세포 방어 능력이 보고되어지고 있다 [23,38]. 산소분자는 mitochondria의 에너지 생산과정인 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에서 전자수용체로 작

용하기 때문에 동물세포의 생존에 필수적이다. 뇌로 공급되는 산소가 심각한 수준으로 떨어지면 에너지 고갈이 일어나는데 5분 이내에 ATP의 90%가 저하된다[22]. 동물세포는 산소압(oxygen tension)의 변화에 반응할 수 있는 유전자 프로그램 을 갖고 있는데, 공급되는 산소가 부족하면 적혈구 생성

Table 6. Signal transduction-related upregulated genes

global.M	Gene	Title
0.4977	Arl2	ADP-ribosylation-like 2
0.45613	Itgb4	integrin beta 4
0.45213	Cspg6	chondroitin sulfate proteoglycan 6
0.406	Csnk2b	casein kinase II beta subunit
0.39464	Gabrd	gamma-aminobutyric acid A receptor, delta
0.39232	Ltbp1	LanC (bacterial lantibiotic synthetase component C)-like 1
0.37226	Gnb5	guanine nucleotide binding protein beta 5
0.36478	Rrad	Ras-related associated with diabetes
0.3607	Gng8	G-protein gamma 8 subunit
0.34953	Ahr	aryl hydrocarbon receptor
0.30368	Mapk1	mitogen activated protein kinase 1
0.29818	Limk2	LIM motif-containing protein kinase 2
0.29468	Nrgn	neurogranin
0.29138	Rgs2	regulator of G-protein signaling protein 2
0.2901	Rab14	GTPase Rab14
0.28139	Ins2	insulin 2
0.27478	Calm3	calmodulin 3
0.26203	Celsr3	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
0.25256	Rab4a	RAB4A, member RAS oncogene family
0.23235	Nras	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
0.2227	Vegf	vascular endothelial growth factor
0.21896	Dgka	diacylglycerol kinase, alpha (80 kDa)
0.21779	Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
0.21534	Chn2	chimerin (chimaerin) 2
0.20973	Npy	neuropeptide Y

Table 7. Signal transduction-related downregulated genes

global.M	Gene	Title
-0.664281	Il6r	interleukin 6 receptor
-0.563218	Cd5	CD5 antigen
-0.484653	Sgne1	secretory granule neuroendocrine protein 1
-0.458012	Igf1	insulin-like growth factor 1
-0.456714	Gng7	guanine nucleotide binding protein, gamma 7
-0.454861	Calcr1	calcitonin receptor-like
-0.454078	Arf1	ADP-ribosylation factor 1
-0.438404	Stmn3	stathmin-like 3
-0.406613	Ptger1	prostaglandin E receptor 1
-0.38777	Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1
-0.353422	Rab10	ras-related protein rab10
-0.347623	Rgs12	regulator of G-protein signaling 12
-0.332877	Pnoc	prepronociceptin
-0.326691	Gcgr	glucagon receptor
-0.314996	Lancl1	lanC (bacterial lantibiotic synthetase component C)-like 1
-0.29693	ErbB3	avian erythroblastosis oncogene B 3
-0.284881	Pak3	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3
-0.281111	Itpr3	inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 3
-0.278397	Adcy4	adenylyl cyclase 4
-0.270721	Sag	retinal S-antigen
-0.25747	Apba3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3 (X11-like 2)
-0.233787	Rab28	RAB28, member RAS oncogene family
-0.215051	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5
-0.211961	Ywhag	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide
-0.206187	Arrb2	arrestin, beta 2
-0.204406	Ednra	endothelin receptor type A

Table 8. Transcription-related genes

global.M	Gene	Title
0.98372	Fosl2	fos-like antigen 2
0.43058	Hmgb2	high mobility group box 2
0.38942	Ssrp1	structure specific recognition protein 1
0.35919	Rara	retinoic acid receptor, alpha
0.34953	Ahr	aryl hydrocarbon receptor
0.32922	Madh2	MAD homolog 2 (Drosophila)
0.31583	Znf148	zinc finger protein 148
0.30368	Mapk1	mitogen activated protein kinase 1
0.28744	Otx1	orthodenticle homolog 1 (Drosophila)
0.28122	Tceb3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3
0.26345	Copeb	core promoter element binding protein
0.24997	Nr2f6	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6
0.24001	Tp53	tumor protein p53
0.22457	Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
0.20274	Rnf4	ring finger protein 4
-0.2264	Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3
-0.227	Ebf	early B-cell factor (olfactory neuronal transcription factor 1)
-0.3144	Fah	fumarylacetoacetate hydrolase
-0.3169	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
-0.3175	Gtf2b	general transcription factor IIB
-0.4066	Tceb3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3

(erythropoiesis)과 혈관신생(angiogenesis)이 촉진되고, ROS의 제거에 필요한 효소가 더 많이 표현된다[18,35]. 또한 줄어든 ATP 생성을 만회하기 위하여 해당(glycolysis)과 포도당 수송(glucose transport)에 관여하는 유전자 표현을 증가시켜 포도당 이용 속도를 증가시킨다[8,15,27,52].

석창포(AGR)는 신온(辛溫)한 방향성 약물로 개심규(開心竅), 거습축풍(祛濕逐風), 계담소적(除痰消積), 개위관중(開胃寬中)하는 효능이 있다[58]. 임상적으론 변민건망(煩悶健忘), 심복통(心腹痛), 혼미(昏迷), 풍비(風痺), 전간(癲癇) 등에 사용되며[59]. 지황음자(地黃飲子), 총명탕(聰明湯), 안신정지환(安神定志丸), 청심온담탕(淸心溫痰湯) 등은 석창포의 이러한 효능을 대표하는 處方이다.

AGR에 대한 실험적 연구로는 AGR의 국소 뇌혈류량 및 혈압에 미치는 효과 및 기전[25], 뇌허혈의 신경 방어효과 보고[27] 등이 있다. 또한 서 등[48]은 저산소증을 유발한 배양한 대뇌신경세포에서 AGR의 세포사 방지 및 산화스트레스에 미치는 영향을 조사한 결과 정상산소 환경과 저산소증에서 대조군에 비하여 세포 생존율이 최고 120.0% 높게 관찰되었음을 보고하였다. 또한 AGR가 저산소증에서 ROS의 농도를 낮추고, MMP 소실을 억제하여 산화스트레스로 인한 세포사를 방지하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 AGR가 저산소증에서 유전자 표현에 미치는 영향을 microarray 기법으로 조사하였다. MA plot의 결과는 대부분의 Global M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 정도 이내의 증감을 나타내었다. 이 가운데 Global M 값이 +0.2 이상 즉, 14% 이상 표현이 증가된 유전자는 750 여종,

-0.2 이하 즉, 14% 이상 표현이 감소된 유전자는 700 여종이었다. 이 결과는 AGR에 의하여 많은 유전자들의 표현 변화가 일어났지만 특정 유전자의 극단적인 증감은 나타나지 않았음을 의미한다. 저산소증에서 AGR에 의하여 수많은 유전자의 표현이 변화되기 때문에 어느 요인에 의하여 세포 보호 효과가 나타나는지는 명확하게 알 수 없었다. 그러나 저산소증에서 세포 보호에 중요한 유전자의 표현 증감을 설명하면 다음과 같다.

Apoptosis와 관련된 유전자 가운데 testis-enhanced gene transcript (TEGT)가 가장 많이 증가하였다(Global M = 0.43). 이 유전자는 Bax inhibitor-1(BI-1)과 같은 것으로 알려졌다[52], BI-1은 apoptosis 억제 유전자이다[8]. TEGT는 동물, 식물 및 효모에서 진화적으로 잘 보존된 stress 저항 유전자로서 본 실험과 같은 저산소증에서도 그 유전자 표현이 증가되어 세포를 보호하는 것으로 보인다. TEGT 다음으로는 Retinoic acid receptor alpha(RAR α)가 많이 증가되었다(Global M = 0.36). RAR α 는 그 기능이 아직 잘 알려져 있지 않으나, hypoxia, cobalt chloride, desferrioxamine에 의하여 transcription가 증가되며, 간세포(hepatic cell)에서는 저산소 스트레스에서 유전자 표현을 조절하는 것으로 추정된다[10]. 또한 대동맥의 평활근 세포 및 내피 세포에서는 저산소 상태에서 RAR α mRNA의 표현이 약 2.5배 증가되는 것으로 보고되었다[5]. Aryl hydrocarbon receptor(AhR)도 상당히 증가하였다(Global M = 0.35). AhR은 basic helix-loop-helix PAS family에 속하는 유전자 전사인자이다. 이 단백질 family는 환경 변화를 감지하고, 적응하는데 관여한다[20]. AhR은 유

해한 xenobiotic compounds(예, 다이옥신)를 감지하는데, 일단 활성화되면 이 단백질은 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)와 이성중합체를 형성하여 유전자의 promoter에 결합하여 유전자 표현을 변화시킨다. AhR이 저산소증에서 어떠한 역할을 하는지는 아직 잘 알려지지 않았다. 그러나 AhR의 신호전달은 저산소증 신호전달과 서로 밀접하게 상호작용을 하고 있으며[39], AhR이 결여된 생쥐에서 보면 apoptosis가 상당히 증가된 것으로 보고되었다[19]. 이러한 보고들은 AhR이 apoptosis 방지하는 것을 시사하며, 저산소증에서 AhR의 표현을 증가시켜 신경세포를 보호하는 것으로 추정된다.

Transforming growth factor- β (TGF β)-inducible early response gene (TIEG)이 증가되었다(Global M = 0.32). 이 유전자는 TGF β 의 조절에 의한 세포의 성장, 분화 및 apoptosis에 중요한 역할을 한다. TIEG는 뇌충격 손상 후 2시간 만에 증가되었으며[33], homoharringtonine(일종의 세포독성물질)에 의해서도 표현이 증가되었다[26]. 이 유전자는 간세포에서 산화적 스트레스 상태에서 증가하여 apoptosis를 매개하는 것으로 알려졌다[41]. 그러나 신경세포에서의 역할에 대하여는 알려진 바가 없으며, 특히 본 연구와 같은 저산소증에서 이 유전자가 신경세포에 어떠한 역할을 하는지는 더 연구를 할 필요가 있다. Defender Against death(Dad) 유전자의 표현이 증가하였다(Global M = 0.27). Dad는 anti-apoptosis 유전자로서[7] 저산소증에서 많이 표현되어 apoptosis를 방지하는 것을 매우 합리적인 것으로 보인다.

Anti-apoptosis 유전자인 tumor protein p53의 표현 또한 증가되었는데(Global M = 0.24), p53은 대표적인 종양억제유전자로서 apoptosis 상태에서 발현이 증가되어 apoptosis를 지연시킨다는 보고가 있다[1]. Akt1의 표현도 증가되었다(Global M = 0.22). Serine-threonine kinase인 Akt는 포유동물세포에서 3가지 isoform(Akt1~Akt3)이 있으며 이들은 서로 80% 이상의 아미노산 순서 상동성과 유사한 구조적 구성을 보인다. Akt1은 DNA 분절과 세포막 phosphatidylserine의 노출을 방지하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[17].

반면에 AGR에 의하여 Global M 값이 0.2 이상으로 표현이 감소되는 유전자는 6종류가 있었다. 이 가운데 가장 많이 감소되는 유전자는 death-associated protein kinase(DAPK)로 나타났다(Global M = 0.55). 이 유전자는 Ca²⁺/calmodulin-dependent serine/threonine kinase로 pro-apoptosis 역할을 한다[17]. 따라서 이 유전자의 표현 감소는 신경세포의 apoptosis를 감소시킬 것으로 예상된다. 이 밖에도 apoptosis에서 세포사에 직접 관련하는 caspase 2, programmed cell death 8(pdcd8) 유전자의 표현은 감소(각각 Global M = 0.26 및 0.28)하였는데 이는 세포사를 방지하는 유익한 방향으로 AGR가 작용함을 의미한다.

한편 세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 가운데 murine thymoma viral (v-akt) oncogene homolog 2(Akt2)가 거의 2배 증가하였다(Global M = 0.93). Serine-threonine kinase인 Akt는 DNA 분절과 세포막 phosphatidylserine의 노출을 방지하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[53]. 따라서 Akt2 유전자 표현의 증가는 신경세포사를 방지하는데 도움을 줄 것으로 보인다. 이 밖에도 세포주기 관련 유전자, 스트레스 반응 관련 유전자, 신호전달 관련 유전자, transcription 관련 유전자 등 많은 유전자들의 표현이 변화되었다.

수많은 유전자들의 표현이 증감되기 때문에 어떤 유전자가 결정적으로 저산소증에서 세포사 방지를 하였는지는 현재로서는 알 수 없다. 그러나 AGR는 ROS의 생성을 저하하고(RAR α , AhR), apoptosis를 억제하며(TEGT, TIEG, Dad, p53, DAPK, caspase 2, pdcd8), 세포성장을 유지하여(Akt1, Akt2) 신경세포사를 방지하는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Ashktorab, H., A. Ahmed, G. Littleton, X. W. Wang, C. R. Allen, R. Tackey, C. Walters and D. T. Smoot. 2003. p53 and p14 increase sensitivity of gastric cells to H. pylori-induced apoptosis. *Dig Dis Sci.* **48**, 1284-1291.
2. Banasiak, K. J. and G. G. Haddad. 1998. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res.* **797**, 295-304.
3. Barks, J.D. and F. S. Silverstein. 1992. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol.* 235-243.
4. Beilharz, E. J. and C. E. Williams, M. Dragunow, E. S. Sirmanne and P. D. Gluckman. 1995. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Mol Brain Res.* **29**, 1-14.
5. Besnard, S., C. Heymes, R. Merval, M. Rodriguez, J. P. Galizzi, J. A. Boutin, J. Mariani and A. Tedgui. 2002. Expression and regulation of the nuclear receptor ROR α in human vascular cells. *FEBS Lett.* **511**, 36-40.
6. Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege and P. J. Price. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci Res.* **35**, 567-676.
7. Brewster, J.L., S. L. Martin, J. Toms, D. Goss, K. Wang, K. Zachrone, A. Davis, G. Carlson, L. Hood and J. D. Coffin. 2000. Deletion of Dad1 in mice induces an apoptosis-associated embryonic death. *Genesis* **26**, 271-278.
8. Chae, H. J., N. Ke, H. R. Kim, S. Chen, A. Godzik, M. Dickman and J. C. Reed. 2003. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* **323**, 101-113.
9. Chang, H. H. P. and P. H. But. 1986. In *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica* vol. 1, pp.

- 334-337. World Scientific Publishing, Singapore.
10. Chauvet, C., B. Bois-Joyeux and J. L. Danan. 2002. Retinoic acid receptor-related orphan receptor(ROR) alpha4 is the predominant isoform of the nuclear receptor RORalpha in the liver and is up-regulated by hypoxia in HepG2 human hepatoma cells. *Biochem J.* **364**, 449-456.
 11. Cho, J., N. E. Joo, J. Y. Kong, D. Y. Jeong, K. D. Lee and B. S. Kang, 2000. Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of Acori graminei rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 31-37.
 12. Cho, J., Y. H. Kim, J. Y. Kong, C. H. Yang and C. G. Park, 2002. Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of Acorus gramineus. *Life Sci.* **71**, 591-599.
 13. Colantuoni, C., A. E. Purcell, C. M. Bouton and J. Pevsner. 2000. High throughput analysis of gene expression in the human brain. *J. Neurosci Res.* **59**, 1-10.
 14. Duggan, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer and J. M. Trent. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* **21**, 10-14.
 15. Ebert, B. L., J. D. Firth, P. J. Ratcliffe. 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol Chem.* **270**, 29083-29089.
 16. Friedman, J. E. and G. G. Haddad. 1993. Major differences in Ca^{2+} response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of Ca^{2+} and Na^+ . *J. Neurosci.* **13**, 63-72.
 17. Fujio, Y., Y. Mitsuuchi, J. R. Testa and K. Walsh. 2001. Activation of Akt2 Inhibits anoikis and apoptosis induced by myogenic differentiation. *Cell Death Differ.* **8**, 1207-1212.
 18. Goldberg M. A., S. P. Dunning and H. F. Bunn. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* **242**, 1412-1415.
 19. Gonzalez, F.J., P. Fernandez-Salguero. 1998. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* **26**, 1194-1198.
 20. Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch, C. A. Bradfield. The PAS superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 519-561
 21. Halliwell, B., J. M. Gutteridge. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* **8**, 89-193.
 22. Hansen, A. 1977. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult brain cortex during anoxia. *Acta. Physiol. Scand.* **99**, 412-420.
 23. Hochachka, P.W., P. Lutz. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **130**, 435-459.
 24. Hsieh, M. T., W. H. Peng, C. R. Wu and W. H. Wang. 2000. The ameliorating effects of the cognitive-enhancing Chinese herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytother. Res.* **14**, 375-377.
 25. Jeong, H. W., S. Y. Kang, S. W. Bak. 1999. Effect of Rhizoma Acori Graminei Extract on Blood Pressure and Regional Cerebral Blood Flow in Rats. *The Korea Association of Herbology* **14**, 81-88.
 26. Jin, W., L. F. Qu, P. Min, S. Chen, H. Li, H. Lu and Y. T. Hou. 2004. Identification of genes responsive to apoptosis in HL-60 cells. *Acta Pharmacol Sin.* **25**, 319-326.
 27. Kang, S. J., H. S. Keum, Y. Y. Jeon, E. J. Lee, C. S. Park, C. G. Park, J. H. Heo., C. H. Yang and J. S. Cho. 2001. The neuroprotective effect of Acori graminei rhizoma extract against cerebral ischemia in rats. *Korean J. Orient. Int. Med.* **22**, 341-351.
 28. Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie and A. R. Currie. 1972. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-245.
 29. Kim, G. O., H. J. Kim, G. H. Park, G. H. Seok, S. Y. Kim, D. K. Ahn and H. C. Kim. 2000. Neuroprotective Effects of Acori graminei rhizoma on the Brain Ischemia induced by Four Vessel Occlusion in Rats. *The Korea Association of Herbology* **15**, 79-85.
 30. Kirino, T. 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239**, 57-69.
 31. Kirino, T. 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239**, 57-69.
 32. Kirino, T., A. Tamura and K. Sano. 1985. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res.* **63**, 39-58.
 33. Kobori, N., G. L. Clifton and P. Dash. 2002. Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **104**, 148-158.
 34. Lee, U. J., G. N. Park S. G. Jeong, Y. Jun and S. G. Kim. 2003. Original Articles : Change in the Intrathecal Cytokine level in Hypoxic-ischemic Encephalopathy after Cardiac Arrest. *The Korean society of Emergency Medicine* **14**, 494-498.
 35. Levy, A.P., N. S. Levy, S. Wegner and M. A. Goldberg. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol Chem.* **270**, 13333-13340.
 36. Martin, L. J., A. M., Brambrink, C. Lehmann, C. Portera-Cailliau, R. C. Koehler, J. Rothstein and R. J. Traystman. 1997. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol.* **42**, 335-348.
 37. McDonald, W., F. S. Silverstein and M. V. Johnston. 1988. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* **459**, 200-203.
 38. Nilsson, G. E. 2001. Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci.* **16**, 217-221.
 39. Nie, M., A. L. Blankenship and J. P. Giesy. 2001. Interactions between aryl hydrocarbon receptor(AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 17-27.

40. Ramsay, G. 1998. DNA chips: state-of-the art. *Nature Biotechnol.* **16**, 40-44.
41. Ribeiro, A., S. F. Bronk, P. J. Roberts, R. Urrutia and G. J. Gores. 1999. The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* **30**, 1490-1497.
42. Rosenbaum, D. M., M. Michaelson, D. K. Batter, P. Doshi and J. A. Kessler. 1994. Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons. *Ann Neurol.* **36**, 864-870.
43. Schena, M., R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier and R. W. Davis. 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* **16**, 301-306.
44. Schwartzman, R. A., J. A. Cidlowski. 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrinol.* **14**, 133 - 151.
45. Semenza, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 588-594.
46. Semenza, G. L., P. H. Roth, H. M. Fang and G. L. Wang. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol Chem.* **269**, 23757-23763
47. Semenza, G. L., B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concorde, P. Maire and Giallongo A. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol Chem.* **271**, 32529-32537.
48. Seo, G. S. 2003. Effects of *Acori graminei rhizoma*(石菖蒲) on the Modulation of ROS, MMP, in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Dongguk graduate school.
49. Watson, A., A. Mazumder, M. Stewart and S. Balasubramanian. 1998. Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr Opin Biotechnol.* **9**, 609-614.
50. Whitney, L.W., K. G. Becker, N. J. Tresser, C. I. Caballero-Ramos, P. J. Munson, V. V. Prabhu, J. M. Trent, H. F. McFarland and W. E. Biddison. 1999. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol.* **46**, 425-428.
51. Widlak, P. 2004. DNA microarrays, a novel approach in studies of chromatin structure. *Acta Biochim Pol.* **51**, 1-8.
52. Xu, Q., J. C. Reed. 1998. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell.* **1**, 337-346.
53. Yukawa, K., K. Hoshino, M. Kishino, M. Mune, N. Shirasawa, A. Kimura, Y. Tsubota, K. Owada-Makabe, T. Tanaka, M. Ichinose, M. Maeda, K. Takeda and S. Akira. 2004. Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int J. Mol Med.* **13**, 515-520.
54. Zimmermann, K. C., D. R. Green. 2001. How cells die: Apoptosis pathways. *J. Allergy Clin Immunol.* **108**, 99-103.
55. Son S. Y. 1979. *sin-nong-bon-cho-gyung*, pp. 38-39, Moonguangdoseoyuhangongsa, Taipei.
56. Lee S. J. 1999. *Bon-cho-kang-mok*, pp. 410-411, Science technology book publisher. Baijing.
57. Wang-Ang. 1989. *Bon-cho-bi-yo*, pp. 44-45, Komoonsa. Seoul.
58. Hco. J. 1999. *Dong-Eui-Bo-Gam*, pp. 965, 961, 1955. Bubnbooks. Seoul