

# MCAo 허혈동물모델에서 육미지황탕 효능에 관한 프로테오믹스 연구

강봉주, 김영옥<sup>1</sup> 조동욱

한국한의학연구원, <sup>1</sup>자생생명공학연구소

## Proteomic Analysis of MCAo Ischemia Model Administered with Yukmijihwangtang

Kang BongJoo, Kim Youngok<sup>1</sup>, Cho Dongwuk

Korea Institute of Oriental Medicine, <sup>1</sup>Jaseng Reserch Center

In the post-genome era, analysis of the cellular transcriptome using microarray or the cellular proteome using a 2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry are most widely used. Stroke is one of the most important causes of death along with cancer and cardiac disease. When pathological change of cells in developed from cerebral ischemia accompanied by stroke administration of neuroprotective drugs before stroke can decreases the degeneration of neuronal cells. The purpose of the present study was to assess the neuroprotective effect and protein expression after administration of P004, middle cerebral artery model of cerebral ischemia in rats. SD rats were subjected to middle cerebral artery occlusion. P004 (1,000 mg/kg) was administered 2 times at 0, 90 minutes after middle cerebral artery occlusion (MCAo). Rats were killed at 48 hours, and infarct area and volume were determined by histology and computerized image analysis. We investigated the protein expression profile on the global ischemia induced by MCAo. This proteomic analysis enable us to identify several proteins differently expressed in infarct brain tissue. The aims of this study were to do investigation comparing the neuroprotection activities of P004 and to understand the mechanism of acted as neuroprotective drug.

key words : proteomics, neuroprotection, stroke, MCAo, Yukmijihwangtang

### I. 서론

사회가 서구화되면서 급격하게 변화함에 따라 뇌혈관질환은 우리나라에서도 이제 가장 중요한 사망원인이 되고 있다. 뇌혈관질환 중 뇌경색과 같이 뇌에 허혈이 발생하면 뇌조직으로 산소 및 포도당의 공급이 부족하게 되어 hypoxia / hypoglycemia를 일으켜서 단시간내에 국소 뇌조

직의 손상을 일으켜 신경이상이 유발된다. 뇌허혈성 손상의 기전으로는 여러 가지가 있지만 대표적으로 흥분성 신경전달물질<sup>1)</sup>, 세포내 칼슘함량증가<sup>2)</sup>, 세포성 에너지 대사에<sup>3)</sup>등이 제시되고 있으며, 최근에는 허혈 및 재관류시 생성되는 활성산소 (reactive oxygen species)에 의한 신경세포 손상<sup>4-5)</sup>과 이에 따른 apoptosis에 의한 신경세포의 사멸<sup>6-7)</sup>이 중요한 요소로 작용된다.

뇌허혈성 손상 기전에 관한 연구를 위해 많은 연구그룹들이 DNA chip을 이용한 대규모 유전체 연구와 대량발굴 탐색 기법을 이용한 단백질체 연구를 진행하고 있다. 이 연구들 중 단백질체연구 (proteomics)는 아직 얼마 되지 않은 개념이며 해결해야만 하는 기술상의 과제를 많이 안고 있

□ 접수 ▶ 2007년 2월 20일 수정 ▶ 2007년 4월 2일 채택 ▶ 2007년 4월 16일  
□ 교신저자 ▶ 강봉주, 대전광역시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원  
Tel 042-868-9487 Fax 042-863-9464 E-mail bj kang@kiom.re.kr

지만 다양한 분야에 적용되어 세포의 발생단계별, 질병시 조직 내 단백질의 변화등을 밝히면서, 유전자의 기능을 알아내고, 이를 통하여 세포 구성원의 기능을 밝힐 수 있어 각광받고 있는 연구방법이고, 질병을 조절할 수 있는 단백질을 찾아내 제약연구를 할 수도 있고, 약의 섭취에 따른 세포 내 변화를 파악함으로써 그 작용기작을 밝힐 수 있을 것이다. 육미지황탕은 송대(宋代) 이래로 수많은 의사들에 의하여 신음허(腎陰虛) 및 간신부족증(肝腎不足證)로 인한 제증(諸症)을 치료하는 데에 사용되어 왔다.<sup>8)</sup> 이에 육미지황탕의 다양한 효능에 대해 연구가 되었고 참고문헌 신장(腎臟)과 관련된 실험적 연구는 많이 되었지만<sup>9-10)</sup> 육미지황탕의 효능기전에 대한 연구보고는 많지 않았다. 이에 육미지황탕의 효능연구에서 먼저 저산소상태에서 뇌신경 보호효과에 대해 우선 연구되었고<sup>11)</sup> 4-vessel occlusion 허혈동물모델에서의 대규모 유전자 발현 연구에서 허혈에 의해 각종 유전자의 발현이 증가되고 일부는 감소되며 기존에 알려진 연구결과와 상당히 일치함을 밝혔다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 MCAo (middle cerebral artery occlusion) 흰쥐모델에서 허혈에 대한 육미지황탕의 신경세포보호효과를 단백질연구 기술인 프로테오믹스 기술을 이용하여 분자생물학적 접근을 시도하고자 했다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 준비

실험에 사용한 숙지황은 경북산 지황 법제한 것을 (주) 옴니허브닷컴으로부터 구입하여 사용하였으며, 산수유는 경북 봉화산, 복령은 북한산, 산약은 경북산, 당귀는 강원도 산 도당귀, 천궁은 경북 청송산, 작약은 경북 의성산, 목단피는 중국 산둥성, 택사는 전남 압태도산, 계지는 중국산을 각각 (주) 옴니허브닷컴으로부터 구입하여 사용했다.

육미지황탕 (이하 P004)은 숙지황, 산수유, 산약, 택사, 복령, 목단피, 계지로 구성되어 있다 (Table 1). 생리활성 및 분석 실험용 탕제의 조제는 마쇄하여 분말로 한 숙지황, 산수유, 산약, 택사, 복령, 목단피, 계지를 Table 1의 비율로 각각 5배량으로 하여 262.5g을 1.5 l 3차 증류수에 넣어 90°C에서 3 시간 환류추출한 것을 실온에 방치하여 침전시킨 후 상층액을 여과하고 여액을 동결건조하여 114.4 g (43.6%)의 엑스를 얻었다.

### 2. 일시적 국소뇌허혈 유발(MCAo, middle cerebral artery occlusion) 및 시료준비

중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐 모형은 체중 240-260 g의 (주) 샘타코에서 미국 타고사에서 부터 수입한 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용했다. 실험실 조건에서 적응시키면서 물과 사료를 충분히 공급하면서 사육하여 280-320 g이 될 때 선별하여 수술 전날 물만 공급하여 실험에 사용했다.

Zea-Longa의 방법을 응용한 intraluminal suture method를 사용했다. 25 mm의 4-0 나일론 봉합사의 끝 부분에서 약 5 mm길이를 실리콘으로 코팅하되 지름이 0.28-0.30 mm가 되게 제작하여 실험에 사용했다. 흰쥐를 70 % N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>가 섞인 혼합가스에 5%의 isoflourane으로 전신마취를 한 후, 목 전방 부위 중양을 피부절개하고 오른쪽 경동맥과 외경동맥을 주위조직과 신경들로부터 조심스럽게 분리했다. 외경동맥 분지인 상부갑상선동맥과 후두동맥을 전기소작기로 소작하고 내경동맥의 분지인 익돌근구개동맥을 전기소작하고 외경동맥을 자르고 probe를 외경동맥에서 내경동맥으로 삽입하되 총경동맥분지에서 약 18-20 mm정도 삽입한 후 실로 고정했다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연 회복시켰다. 수술 90분 후 같은 방법으로 재마취하여 probe를 후퇴시켜 재관류 시켰다. 모든 수술과정은 isoflourane을 2%로 유지하면서 수술현미경하에서 시행하였으며, 체온이 37 ± 0.5 °C 이하로 떨어지지 않도록 체온유지장치 (Harvard apparatus, Holliston, MA)를 이용했다.

P004의 투여시(n=3)의 뇌허혈에 대한 신경방어효과를 측정하기 위하여 추출물을 뇌허혈 유발 후 0분 및 120분에 1,000 mg/kg의 용량으로 2회 경구투여 했다. 대조군(n=3)은 증류수를 동량 투여했다.

MCAo 모델 rat brain 2번 slice를 homogenize한 후 8M urea, 50 mM DTT, 4% CHAPS, 0.2% carrier ampholytes, 0.0002% bromophenol blue를 50 ml에 맞추어 제조한 sample solubilization solution에 넣고 resuspension 했다. 5 초동안 sonication을 3번 반복하여 cell lysis를 했다. Cell lysate를 원심분리해서 상층액을 새로운 tube에 옮기고 시료를 protein assay (Bradford법)를 통해 정량했다.

### 3. 2-D 전기영동과 소프트웨어 분석

정량한 시료를 125 µg / 185 µl 농도로 희석하여 시료를 준비하고 focusing tray의 각 well에 넣고 한 well에 시료를 골고루 넣어 IEF cell 안에서 12시간 동안 방치했다.

condition step : 250V, 20분  
 Ramping step : 8,000V, 2시간 30분  
 Focusing step : 8,000V, 20,000V-hr  
 Holding step : 500V

2 ml equilibration buffer I (urea 6 M, SDS 2%, Tris 0.37 M, glycerol 20%, DTT 2%)에 넣어서 15분간 shaking 하고 2 ml equilibration buffer II (urea 6M, SDS 2%, Tris 0.37M, glycerol 20%, iodoacetamide 2.5%)에 넣고 15분간 shaking 했다.

Precast gel(Bio-rad, CA, USA) 표면을 전체적으로 3차 증류수를 이용해서 washing하여 과도한 acrylamide를 제거하고 0.5% agarose를 넣고 IPG strip을 삽입한 후 2,000V에서 65분간 전기영동 했다.

전기영동이 끝나면 gel을 유리판에서 떼어낸 후 gel을 fixative enhancer soluton (50% methanol, 10% acetic acid, 10% fixative enhancer concentrate (Bio-rad, CA, USA))에 20분동안 gel을 고정했다. 3차 증류수 400 ml로 10분간 washing 했다. 3차 증류수를 버리고 다시 반복해서 washing하고 염색액에 넣어 20분간 염색한다. 5% acetic acid에 넣어서 15분동안 염색을 중지시키고 3차 증류수로 washing 했다.

스캐너로 gel을 스캐닝한 후 PDQuest (ver 7.2, Bio-rad, CA, USA)에서 영상을 분석하여 3배이상 증감된 spot들을 분리했다.

#### 4. In-gel digestion과 Mass spectrometry 분석

30 mM potassium ferricyanide와 100 mM sodium thiosulfate를 1:1로 섞어서, gel 조각에 50  $\mu$ l 넣고, gel의 silver염색이 없어질 때까지 vortex 하고 증류수로 2회 세척했다. gel이 있는 튜브에 100% acetonitrile을 넣고, 10분간 정치 후 버리고 말렸다. 1 M DTT 5  $\mu$ l와 0.1 M ammonium bicarbonate 500  $\mu$ l을 각 e-tube에 넣고 56°C에서 30분간 반응후 제거하고 iodoacetamide (10 mM)로 25분간 alkylation 시켰다.

Acetonitrile 15  $\mu$ l와 0.1 M ammonium bicarbonate 15  $\mu$ l를 넣고 10분간 정치후 버리고 acetonitrile 50  $\mu$ l넣고 10분간 정치후 버린다. 0.1M ammonium bicarbonate를 넣고 10분간 정치 후 버린다. Acetonitrile 70  $\mu$ l를 넣고 10분간 정치를 2번 반복한 후 버리고 건조시키고 trypsin(자가분해 억제를 위해 변형된) 1  $\mu$ g을 50 mM ammonium bicarbonate 90  $\mu$ l에 녹여서 30  $\mu$ l를 e-tube에 넣어 37°C

에서 8~12시간반응 후 50% acetonitrile과 0.3% TFA 수용액을 50  $\mu$ l 가해 30분간 실온에서 방치 후 스피ندا운 하여 용액부분을 새로운 튜브로 회수했다. 미리 50°C 보온해 놓은 heat block위에 튜브의 뚜껑을 열어서 놓고 추출액이 5  $\mu$ l이하로 될 때까지 농축한다. 0.3% TFA수용액을 10  $\mu$ l 넣어 현탁시킨 후, Ziptip으로 salte등을 제거하고 농축한 후 MALDI plate 위 matrix와 혼합하여 건조시킨 후, MALDI-TOF MS(Voyager-DETM, STR Biospectrometry, Applied Biosystems Inc.)로 분석했다.

MALDI-TOF MS로부터 나온 peak 데이터들은 인터넷상에 있는 Protein Prospector program (<http://prospector.ucsf.edu>) 과 MASCOT (<http://www.matrixscience.com>)를 사용하고 database는 Swiss Prot database와 NCBI의 database에서 검색작업을 했다.

### III. 결 과

흰쥐를 MCAo 방법으로 뇌허혈을 일으키고 P004를 투여하여 뇌허혈 치료효능을 확인했다. 그리고 sham, 뇌허혈을 유발쥐, P004 투여쥐로부터 뇌를 분리하여 infarct된 부분의 전체 단백질을 추출하여 4~7pH 범위의 IPG 스트립으로 IEF를 한 후, 이차원 전기영동으로 분자량에 따라 분리하고, 단백질의 발현 양상을 비교분석했다 (Figure 1). 그 결과 약 1,200개의 단백질중 3% 정도가 3배 이상 그 발현이 변화됨을 관찰했다 (Figure 2). 변화되는 단백질들을 질량분석기를 이용하여 peptide mass fingerprinting (PMF)으로 동정했다 (Table 2).

Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase가 뇌허혈시 감소되었다가 P004투여시 증가되었다. Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase는 etherlipid와 plasmalogene의 생합성과정에 관여하는 효소이고 아래와 같은 효소반응을 일으킨다.

$$\text{Acyl-CoA} + \text{glycerone phosphate} = \text{CoA} + \text{acylglycerone phosphate}$$

Beta-arrestin 2 (arrestin, beta 2)는 뇌허혈시 감소되었다가 P004 투여시 증가되었다. Beta-arrestin 2는 주로 신경 조직에 많이 분포되어 있으며 G-protein signal transduction에 관여하는 것으로 알려져 있고<sup>13)</sup> beta-adrenergic receptor 기능을 조절하는데 beta-arrestins이 인산화된 beta-adrenergic receptors 결합하여 G-protein에 활성을 억제한다.

Table 1. Components of Yukmijihwang-tang (P004).

	Scientific name	Weight (g)
熟地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i> Makino (Scrophulariaceae)	15
山茱萸	<i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini (Cornaceae)	7.5
山藥	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne (Dioscoreaceae)	7.5
澤瀉	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk (Alismataceae)	5.625
茯苓	<i>Poria cocos</i> Wolf (Polyporaceae)	5.625
牡丹皮	<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews (Paeoniaceae)	5.625
桂枝	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume (Lauraceae)	5.625
		52.5

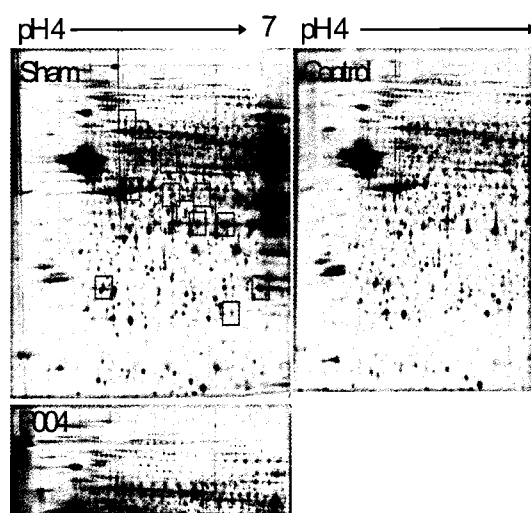


Fig 1. Characteristic proteome of MCAo ischemia model: brain extract was separated by 2-D gel electrophoresis (10% PAGE in the second dimension) and stained with silver dye. Several hundred clearly separated protein spots are visible.

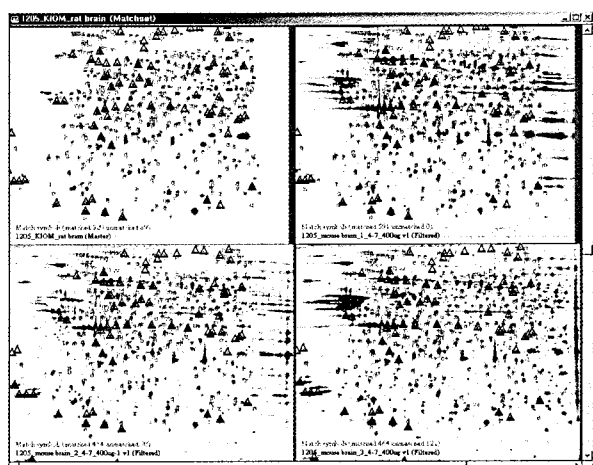


Fig 2. Image analysis of 2D gel used PDQuest 7.2 program (Bio-Rad, CA, USA)

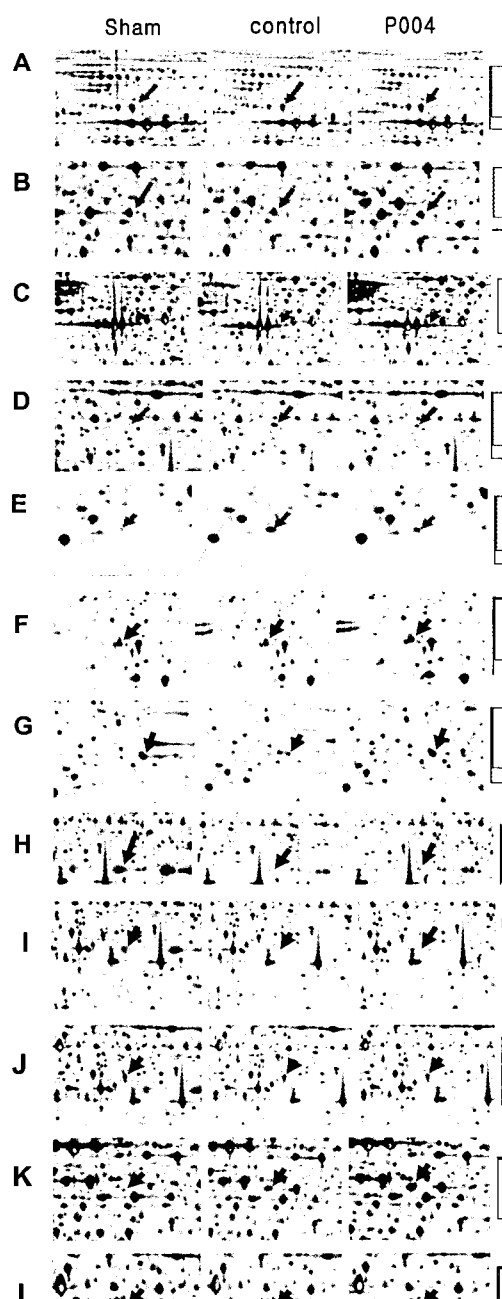


Fig 3. Comparison of brain protein changes in the infarct brain proteome of sham, MCAo ischemia control, and P004 treated group. Selected 2-D gel regions are shown here enlarged and overlapped protein spots marked. The graph was presented express protein alterations. The bar represent OD (spot intensities) by area.

(A) dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT), (B) Beta-arrestin 2 (Arrestin, beta 2), (C) Prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor, (D) heat shock-related 70 kd protein 2 (heat shock protein 70.2), (E) ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor, (F) Receptor-type protein-tyrosine phosphatase R precursor (Protein-tyrosine phosphatase PCPTP1), (G) triosephosphate isomerase, (H) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (38 kDa BFA-dependent ADP-ribosylation substrate), (I) muscarinic acetylcholine receptor m5, (J) caspase recruitment domain protein 9 (rCARD9), (K) dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2), (L) Ena/vasodilator stimulated phosphoprotein-like protein (Ena/VASP-like protein).

Table 2. Identified brain protein spots

No.	Identified proteins	Accession No. <sup>a)</sup>	Mr <sup>b)</sup>	pl <sup>c)</sup>
1	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)	Q9ES71	77,076	7.8
2	Beta-arrestin 2 (Arrestin, beta 2)	P29067	46340	7.6
3	Prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor	Q62786	98732	6.2
4	heat shock-related 70 kd protein 2 (heat shock protein 70.2)	P14659	69529	5.4
5	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	P15999	58827	9.2
6	Receptor-type protein-tyrosine phosphatase R precursor (Protein-tyrosine phosphatase PCPTP1)	O08617	73908	8.3
7	triosephosphate isomerase (tim)	P48500	26921	6.4
8	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (38 kDa BFA-dependent ADP-ribosylation substrate)	P04797	35836	8.4
9	muscarinic acetylcholine receptor m5	P08911	60137	9.3
10	Caspase recruitment domain protein 9 (rCARD9)	Q9EPY0	62632	5.5
11	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2)	P47942	62278	6.0
12	Ena/vasodilator stimulated phosphoprotein-like protein (Ena/VASP-like protein)	O08719	42095	8.7

a) Accession number in Swiss Prot

b) Theoretical pl and Mr (Da)

c) Classified protein spot patterns

Prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor는 뇌허혈시 감소되었고 P004투여시 증가되었다. Prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor는 prostaglandin F2-alpha (PGF2-alpha) 에 특이적인 FP receptor에 결합하여 평상시보다 receptor수를 감소시켜 억제한다<sup>14)</sup>. Heat shock-related 70 kd protein 2는 뇌허혈시 급격히 증가했다가 P004투여시 감소하여 sham 발현량과 동일하게 관찰되었다. Heat shock-related 70 kd protein 2는 HSP70의 family로 HSP70의 주요기능의 하나가 생리적·환경적스트레스로부터의 세포보호작용임이 일반적으로 널리 인식되어져왔고 ATP와 결합하여 다양한 기능을 보여주는데 막 통과 수송기능을 가지고 있고<sup>15)</sup> 단백질 complex의 조립과 해체 그리고 folding의 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>16)</sup>. 일부연구자들에 의해 HSP70의 허혈성 손상으로부터의 뇌조직 보호작용이 제안되었다. ATP synthase alpha chain 뇌허혈시 급격히 증가했다가 P004투여시 감소하여 sham 발현량과 동일하게 관찰되었다. ATP synthase alpha chain은 mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase alpha subunit로서 막을 가로질러 proton을 운반하여 PMF(proton motif force)를

에너지로 ATP를 생산하고 alpha chain은 조절작용을 담당한다<sup>17)</sup>.

그리고 Receptor-type protein-tyrosine phosphatase R precursor, Receptor-type protein-tyrosine phosphatase R precursor (Protein-tyrosine phosphatase PCPTP1), triosephosphate isomerase, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (38 kDa BFA-dependent ADP-ribosylation substrate), muscarinic acetylcholine receptor m5, caspase recruitment domain protein 9 (rCARD9), dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2), Ena/vasodilator stimulated phosphoprotein-like protein (Ena/VASP-like protein)등의 발현 현화가 관찰되었다 (Figure 3).

#### IV. 고찰

유전자의 집합체인 genome의 최종산물로서 인간의 생로병사와 관련된 세포의 모든 활동의 정보를 가지고 있는 단백질의 집합체이다. 세포의 유전자 발현 과정에서의 Proteome의 역할은 아래의 그림과 같은데 2003년 전체 인간 게놈이 밝혀진 후 'Post-genomic era'에서는 1) Protein micro-characterization, 2) 'Differential display' 3) Protein-Protein 상호작용의 단백질학의 연구방향이 활발하게 될 것이다. Mass Spectrometer의 계속적 발달로 인하여 attomole이하의 단백질의 동정할 수 있게 될 것이고, 유전정보에서 얻은 수많은 Antibody Library를 Protein Chip에 활용할 수 있을 것이다. 더욱이 *in vivo*에서 Two-hybrid system과 Phage Display등을 이용한 'Proteome 상호작용'의 연구가 Proteomics 기법으로 연구될 것이다.

흰쥐를 MCAo 방법으로 뇌허혈을 일으키고 P004를 투여하여 뇌허혈 치료효능을 확인한 결과 약 1,200개의 단백질 중 3% 정도가 3배이상 그 발현이 변화됨을 관찰했다. 변화되는 단백질들을 질량분석기를 이용하여 peptide mass fingerprinting (PMF)으로 동정했다.

Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase가 뇌허혈시 감소되었다가 P004투여시 증가되었다. Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase는 etherlipid와 plasmalogene의 생합성과정에 관여하는 효소이다. Beta-arrestin 2는 주로 신경조직에 많이 분포되어 있으며 G-protein signal transduction에 관여하는 것으로 알려져 있고 beta-adrenergic receptor 기능을 조절하는데 beta-arrestins이 인산화된 beta-adrenergic receptors 결합하여

G-protein에 활성을 억제한다. Prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor는 뇌허혈시 감소되었고 P004 투여시 증가되었다. Prostaglandin F2 receptor negative regulator precursor는 prostaglandin F2-alpha (PGF2-alpha)에 특이적인 FP receptor에 결합하여 평상시보다 receptor 수를 감소시켜 억제한다. Heat shock-related 70 kd protein 2는 뇌허혈시 급격히 증가했다가 P004투여시 감소하여 sham 발현량과 동일하게 관찰되었다. Heat shock-related 70 kd protein 2는 HSP70의 family로 HSP70의 주요기능의 하나가 생리적·환경적스트레스로부터의 세포보호작용임이 일반적으로 널리 인식되어져왔고 ATP와 결합하여 다양한 기능을 보여주는데 막통과 수송기능을 가지고 있고 단백질 complex의 조립과 해체 그리고 folding의 중요한 역할을 담당하고 있다. 일부연구자들에게 의해 HSP70의 허혈성 손상으로부터의 뇌조직 보호작용이 제안되었다. ATP synthase alpha chain 뇌허혈시 급격히 증가했다가 P004투여시 감소하여 sham 발현량과 동일하게 관찰되었다. ATP synthase alpha chain은 mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase alpha subunit로서 막을 가로질러 proton을 운반하여 PMF(proton motif force)를 에너지로 ATP를 생산하고 alpha chain은 조절작용을 담당한다.

Receptor-type protein-tyrosine phosphatase R precursor (Protein-tyrosine phosphatase PCPTP1)는 세포질내에서 활성화된 상태에서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) sequester 역할을 한다<sup>18)</sup>. Triosephosphate isomerase (TPI)의 결핍시에는 용혈성 빈혈과 severe neurological disorder 을 일으킴. glycolysis의 중요한 역할을 담당하고 효율적인 에너지 생성에 필수적이다. hypoxia 상태의 정상세포에서는 de-novo 경로를 이용해서 세포가 TPI를 생산한다<sup>19)</sup>. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase는 세포질에 존재하며 탄수화물 대사에 관여하는 효소로서 tRNA와 불기도 하며, uracil-DNA glycosylase 활성을 가지고 있으며 neuron에서 전사가 활성화되고 과발현시 apoptosis에서 killing protein 역할을 하기도 한다<sup>20)</sup>. Muscarinic acetylcholine receptor는 G protein의 작용을 통해 칼륨 채널을 조정하는 adeflate cyclase를 억제하는등 다양한 세포작용을 매개한다<sup>21)</sup>. Caspase recruitment domain protein 9 (rCARD9)는 BCL10을 통해서 NF-kappa-B를 활성화 시킨다<sup>22)</sup>. Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2)는 신경 growth cone 파괴에 관여하고 axon 형성을 유도한다<sup>23)</sup>. Ena/VASP는 actin과 연관되어 있는 단백질로 cytoskeleton 재형성과 axon을 안내하

고 세포를 이동하게 하는 cell polarity에 관여한다. EVL은 actin의 핵형성과 중합을 강화시킨다<sup>24)</sup>.

뇌에 허혈이 발생하면 뇌조직에의 산소 및 포도당의 공급이 부족하게 되는 hypoxia/hypoglycemia를 일으켜 국소 뇌조직의 손상을 초래하여 신경학적 이상이 유발된다. 뇌 허혈성 손상의 기전으로는 여러 가지가 있지만 최근에는 허혈 및 재관류시 생성되는 활성산소와 apoptosis가 신경세포의 사멸에 중요한 역할로 작용되는 것으로 알려졌다.

특히 분자량 70kD인 hsp70 (Heat shock protein 70)의 증가는 thermotolerance 현상과 매우 밀접한 관계를 가지고 있고<sup>25)</sup>, hsp70에 대한 antisense DNA나 항체로 세포내 hsp70을 낮추면 스트레스에 대한 세포 손상이 증가되고 또한 세포 생존율이 감소됨이 관찰되었다. 세포손상에 대한 hsp70 보호효과는 널리 인정되고 있으나 허혈에 의한 뇌손상 부위별 차이와 hsp70 관계는 초기에 hsp70가 세포가 처한 스트레스의 정도를 나타내주는 지표로만 생각되었으나 허혈이 반복해서 가해지는 치명적 허혈에 대한 저항성을 부여함으로써 손상을 감소시켜주는 허혈내성 (ischemic tolerance)현상이 뇌조직과 더불어 여러 다른 조직들에서도 관찰되었고 이때의 허혈이 hsp70의 발현을 증가시키는 것이 밝혀졌다.

Hsp70이 Bag-1이라는 신호전달 조절 단백질에 결합하는데, 건강한 환경에서 Hsp70이 Bag1에 결합하지 않을 때는 Bag1이 Raf-1이라는 다른 단백질에 결합하여 신호전달이 이루어지도록 한다. Hsp70에 결합할 수 없는 돌연변이 Bag-1을 통한 연구에서 Hsp70-이 Bag-1에 결합하여 세포의 증식을 조절하는 스트레스 센서임이 밝혀졌다<sup>26)</sup>.

허혈전처치(ischemic preconditioning)의 연구에서도 허혈전처치는 apoptosis과정의 방지조절과정을 통하여 치사강도의 스트레스를 방어한다고 알려져 있다<sup>27)</sup>. NO, adenosine 및 PKC (protein kinase-C), HSP등이 허혈전처치에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 sham에 비해 허혈 후 발현량이 증가했으나 P004 투여후 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

본 연구결과에서는 허혈에 의해 현재까지 뇌허혈에 효과가 있다고 알려져 있는 각종 당제의 효과의 기전에 대해서 알려진 바는 없고 단지 당제가 대한 신체의 생리·생화학적 변화에 대한 연구가 주로 이루어져서 한약재 효과에 대한 기전연구가 매우 미흡하여 향후 유전체(genomics)연구와 단백질체(proteomics)의 추가적 연구를 통하여 중풍 및 기타 질환에 대한 한약제의 효과를 분자생물학적으로 규명할 수 있도록 하여야 할 것이다.

## V. 참고문헌

1. Choi DW, 「Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system」, 『Neuron』, 1988;1(8):623-634.
2. Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A, 「Calcium and ischemic injury」, 『N Engl J Med』, 1986;314(26):1670-1676.
3. Meyer FB, 「Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury」, 『Brain Res Brain Res Rev』, 1989;14(3):227-243.
4. McCord JM, 「Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury」, 『N Engl J Med』, 1985;312(3):159-163.
5. Schmidley JW, 「Free radicals in central nervous system ischemia」, 『Stroke』, 1990;(21)7:1086-1090.
6. Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, Schroeder KK, 「Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion」, 『Brain Res Mol Brain Res』, 1995;32(1):116-124.
7. Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan J, Zhou RL, Simon RP, 「bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat」, 『Neuroreport』, 1995; (6)2:394-398.
8. 허준, 『동의보감』, 서울:남산당, 1987:147.
9. Chen Y, Qu C, Zhong H, Xue Y, Zhou C, Li W, Cheng X, 「Effects of liuwei dihuang wan and some other TCM drugs on bone biomechanics and serum 25 (OH)D3 content in rats」, 『Journal of Traditional Chinese Medicine』, 1994;14: 298-302.
10. Jiang TL, Yan SC, Wang SF, Wu GL, Feng GW, Li LF, Li XM, 「Effect of “liuwei dihuang” decoction on prevention and treatment of tumor」, 『Journal of Traditional Chinese Medicine』, 1984;(4):59-68.
11. 강봉주, 홍성길, 조동욱, 「저산소상태에서 육미지황원의 뇌신경세포 보호효과에 대한 연구」, 『한국한의학연구원 논문집』, 2001;7(1):115-124.
12. 강봉주, 홍성길, 김윤택, 김영옥, 조동욱, 「4-Vessel Occlusion 허혈동물모델에서의 대규모 유전자 발현 연구」, 『한국한의학연구원 논문집』, 2000;6(1):89-98.
13. Attramadal H, Arriza J.L., Aoki C., Dawson T.M., Codina J., Kwatra M.M., Snyder S.H., Caron M.G., Lefkowitz R.J., 「Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family」, 『J. Biol. Chem.』, 1992;267:17882-17890.
14. Orlicky DJ, Berry R, Sikela JM, 「Human chromosome 1 localization of the gene for a prostaglandin F2alpha receptor negative regulatory protein」, 『Hum Genet.』, 1996;97(5):655-658.
15. Deshaies R.J., Koch B.D., Schekman R., 「The role of stress proteins in membrane biogenesis」, 『Trends Biochem. Sci.』, 1988;13:384-388.
16. Craig E.A., Gross C.A., 「Is hsp70 the cellular thermometer?」, 『Trends Biochem. Sci.』, 1991;16:135-140.
17. Lee JH, Garboczi DN, Thomas PJ, Pedersen PL., 「Mitochondrial ATP synthase. cDNA cloning, amino acid sequence, overexpression, and properties of the rat liver alpha subunit」, 『J Biol Chem.』, 1990;265(8):4664-4669.
18. Sharma E., Lombroso P.J., 「A neuronal protein tyrosine phosphatase induced by nerve growth factor」, 『J. Biol. Chem.』, 1995;270:49-53.
19. Niitsu Y, Hori O, Yamaguchi A, Bando Y, Ozawa K, Tamatani M, Ogawa S, Tohyama M., 「Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes」, 『Brain Res Mol Brain Res.』, 1999;74(1-2):26-34.
20. Tajima H, Tsuchiya K, Yamada M, Kondo K, Katsube N, Ishitani., 「Over-expression of GAPDH induces apoptosis in COS-7 cells transfected with cloned GAPDH cDNAs」, 『Neuroreport.』, 1999;10(10):2029-2033.
21. Kurtenbach E., Curtis C.A.M., Pedder E.K., Aitken A., Harris A.C.M., Hulme E.C., 「Muscarinic acetylcholine receptors. Peptide sequencing identifies residues involved in antagonist binding and disulfide bond formation」, 『J. Biol. Chem.』, 1990;265:13702-13708.
22. Bertin J., Guo Y., Wang L., Srinivasula S.M., Jacobson M.D., Poyet J.-L., Merriam S., Du M.-Q., Dyer M.J.S., Robison K.E., DiStefano P.S., Alnemri E.S., 「CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with Bcl10/CLAP and activates NF-kappa B」, 『J. Biol. Chem.』, 2000;275:41082-41086.

23. Minturn J.E., Fryer H.J.L., Geschwind D.H., Hockfield S., 「TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a C. elegans gene involved in axon outgrowth」, 『J. Neurosci.』, 1995;15:6757-6766.
24. Ohta S., Mineta T., Kimoto M., Tabuchi K., 「Differential display cloning of a novel rat cDNA (RNB6) that shows high expression in the neonatal brain revealed a member of Ena/VASP family」, 『Biochem. Biophys. Res. Commun.』, 1997;237 : 307-312.
25. Xu XH, Zhang HL, Han R, Gu ZL, Qin ZH, 「Enhancement of neuroprotection and heat shock protein induction by combined prostaglandin A1 and lithium in rodent models of focal ischemia」, 『Brain Res.』, 2006;1102(1): 154-162.
26. Song J, Takeda M, Morimoto RI., 「Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth」, 『Nat Cell Biol.』, 2001;3(3):276-282.
27. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA., 「Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase- dependent pathway」, 『Hepatology』, 1999;30(5) : 1223-1231.