

DNA chip을 이용한 乾癬의 한방치료에 관한 유전체 연구

김병수 · 이상근¹ · 김현웅² · 이증훈² · 임종순¹ · 강정수*

대전대학교 한의과대학 생리학교실, 1:대전대학교 동서생명과학연구원, 2:충남대학교 의과대학 피부과

DNA chip Analysis of Psoriatic Skin during the Oriental Remedy

Byoung Soo Kim, Sang Keun Lee¹, Hyun Woong Kim², Jeung Hoon Lee², Jong Soon Lim¹, Jung Soo Kang*

*Department of Physiology, College of Oriental Medicine, 1:Institute of Traditonal Medicine & Bioscience, Daejeon University
2:Department of dermatology, College of Medicine, Chungnam National University*

Psoriasis is a chronic inflammatory disease of the skin characterized by epidermal hyperplasia, dermal angiogenesis, infiltration of activated T cells, and increased cytokine levels, and affects 1-3% of the world-wide population. Although many immunological and clinical reports indicate a role for the immune system in the pathogenesis of psoriasis, puzzling questions about psoriasis remain unsolved. During the several decade, immunosuppressor and PUVA treatment are ubiquitously used to psoriasis therapy. But recently, to promote terminal differentiation of keratinocytes, block either NK-Tcell or T- cell activation, and interrupting the angiogenic switch represent another therapeutic opportunity in psoriasis. To keep face with immunological therapy, the needs of newly designed prescription on the psoriasis treatments were demanded. With the object of understand the psoriasis from an orient medical point of view, patients were administrated the GY during several weeks. We investigated the changes of gene expression in involved and uninvolved skin samples during the oriental remedy. Microarray data showed several important results. First, Gene expression profiling is similar to each patient. Secind, precursor proteins that organize cornified envelops are decreased at the end of remedy. But genes which related to apoptosis, G-protein signalling, and lipid metabolism are increased. Third, 68.5% of clustering genes localized on the psoriasis susceptibility locus. In our results indicated that GY influence on the keratinocytes hyperproliferation by regulating the gene, which located on the psoriasis susceptibility locus.

Key words : Gami-yunbueum(加味潤膚飲), psoriasis, oriental medicine

서 론

건선은 구진 및 인설 등을 동반한 대단히 완고한 만성 피부 질환으로 전 인구의 약 1-3%에 이환이 되어있다. 또한 단순한 외부 감염 등으로 설명되지 않는 종합적인 면역질환으로 이해되고 있어 세계 각국에서 많은 연구와 투자를 하고있는 질환임에도 불구하고 아직 정확한 기전이나 전문 치료약을 개발되지 않고 있다. 단지 면역억제제와 광선요법정도가 밝혀졌는데, 이 즈음에 한의학에서도 난치병인 건선의 치료기전을 분자생물학적 관점에서 분석하고 연구해야 한다고 사료된다.

이에 본 연구는 한약재인 加味潤膚飲으로 건선환자를 임상적으로 치유한 뒤, 그 조직을 microarray를 통하여 치료 전·후를 비교 분석하여 약간의 지견을 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 조직 채취

건선 환자 조직을 1차적으로 채취한 후, 加味潤膚飲을 지속적으로 복용케 하고 건선 부위가 호전(PASI가 호전)된 후 2차 조직을 채취하였다. 실험 대조군으로 사용할 정상 조직은 동일인의 대칭 부위에서 채취하였다. Shave biopsy¹⁾를 통해 얻은 조직은 cryovial에 담아 액체 질소에서 급냉 후 사용 시까지 -80℃에서 보관하였다.

* 교신저자 : 강정수, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학

· E-mail : omdkjs@dju.ac.kr, Tel : 042-280-2617

· 접수 : 2004/01/27 · 수정 : 2004/02/24 · 채택 : 2004/03/29

2) 시약

실험에 사용한 시약은 Human Cot-1 DNA, Superscript RT, nucleotides(Gibco-BRL, USA), Yeast tRNA, poly(A) RNA, Trisma base, Sodium chloride, Sodium dodesy sulfate(Sigma, USA), Oligo d(T)20(Bioneer, Korea), Cyanine-3, Cyanine-5 (NEN, USA), RNazolB(Tel-test, USA), Microcon YM-30 (Amicon, USA), PCR purification kit(Quiagen, Germany), RNasein(Promega, USA), 7.5K human DNA chip, hybridization chamber 및 GT rack(GenomicTree Co. Inc., Korea) 등이다.

2. 방법

1) 피부 조직으로부터 total RNA 추출

채취 한 조직은 외과 수술 메스로 가능한 작게 절단하였다. 절단된 조직에 RNazolB 1,000 μ l를 가해 세포가 완전히 용해 될 때까지 pipette를 이용하여 고루 섞어 주었다. 세포가 완전히 용해된 것을 확인하고 전체 볼륨에 1/10의 chloroform을 첨가하여 vortex로 강하게 15 초간 혼합하고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 13,000 rpm에서 원심 분리하여 상층 액을 취하고 동일량의 isoamylalcohol을 첨가해 얼음에서 15 분간 방치하여 RNA를 침전시켰다. 이를 다시 3,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 RNA를 침전시키고 70% 에탄올로 세척, 건조 후 20 μ l의 DEPC가 처리된 증류수에 녹여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2) In vitro transcription을 통한 RNA 증폭

조직으로부터 얻어진 total RNA는 DNA chip 분석에 사용하기에는 적은 양이어서 충분한 양의 RNA를 얻을 수 없었다. in vitro transcription 과정을 통해 충분한 양의 RNA를 증폭시켰다²⁾. First strand cDNA의 합성은 얻어진 total RNA 1 μ g과 oligo-dT(15)- T7 primer(5'-AAA CGA CGC CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC-3') 1 μ l을 포함하는 9 μ l를 70 $^{\circ}$ C에서 3 분간 denaturation을 시키고 상온에서 priming시켰다. 5 \times reverse transcription buffer 4 μ l, 0.1 M dithiothreitol 2 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, RNasin 1 μ l, template switch primer(5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3') 1 μ l(1 μ g/ μ l), 그리고 Superscript II reverse transcriptase 2 μ l을 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 반응시켰다. Full-length ds-DNA의 합성은 일차 반응액에 H₂O 106 μ l, 10X ExTaq buffer 15 μ l, 10 mM dNTP 3 μ l, RNaseH 1 μ l, ExTaq 3 μ l를 첨가하여 반응액을 만들었다. 반응액은 37 $^{\circ}$ C에서 2 분간 반응 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 3분, annealing 65 $^{\circ}$ C에서 3 분, extension에 72 $^{\circ}$ C에서 10 분의 cycle을 10회 반복하였다. 반응 후 spin column으로 정제하였다. In vitro transcription은 ds cDNA 5 μ l, 10 mM NTPs(ATP, GTP, CTP and UTP) 3 μ l, T7 RNA polymerase 2 μ l와 합하여 50 μ l을 37 $^{\circ}$ C에서 3 시간 동안 반응하고 반응 후 RNazolB를 이용하여 RNA만을 정제하였다.

3) Probe의 fluorescence labeling

준비된 aRNA 2 μ g에 2 μ l의 Oligo dT(5'-TTTTTTTTT TTTTTTTTTVN-3'; μ g/ μ l)를 첨가하고 15.4 μ l가 되도록 증류수를 첨가하였다. 이를 65 $^{\circ}$ C에서 10 분간 변성 후 얼음에 냉각시켰

다. 5 \times first-strand buffer 6 μ l, 0.1M DTT 3 μ l, unlabeled dNTPs 0.6 μ l를 첨가한 뒤 정상 조직(Uninvolved) RNA는 1 mM Cy3-dUTP, 건선 조직(Involved) RNA는 1 mM Cy5-dUTP을 각각 3 μ l씩 넣고 Superscript II(Gibo-BRL, 200 u/ μ l) enzyme를 2 μ l씩 첨가하여 원심 분리 후 42 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 각각의 product를 QIA quick PCR purification kit를 이용하여 최종 50 μ l로 2회 elution하였다.

4) Blocking 및 DNA-chip hybridization

Probe hybridization하기 전 chip은 blocking solution(5 \times SSC, 0.1% 10 mg/ml BSA)에서 42 $^{\circ}$ C에서 30 분간 blocking하고 증류수에서 2회, isopropanol에서 1회 각 일 분간 세척하고 spin dry 하였다. Cyanine dye로 labelling된 두 개의 probe를 섞은 다음 Human Cot1 DNA 20 μ l, poly RNA 2 μ l, Yeast tRNA 2 μ l 첨가한 뒤 Microcon-30을 사용하여 12 μ l로 만들었다. 여기에 20 \times SSC 15 μ l, 2% SDS 3 μ l 그리고 formamide 30 μ l를 첨가하여 60 μ l의 hybridization 용액을 만들고 apply하기 전 100 $^{\circ}$ C에서 3 분간 가열 후 사용하였다. Hybridization은 GT hybridization chamberTM의 down reserver에 5 \times SSC을 spotting 한 뒤, blocking을 끝낸 chip은 chamber의 중앙에 위치시키고 핀셋과 tip을 이용하여 cover slip 덮은 뒤 hybridization 용액을 틈 사이로 조심스럽게 넣어 주었다. Chamber 조립 후 GT chamber station-TM에 얹어 42 $^{\circ}$ C water bath에서 12 시간 hybridization하였다.

5) Stringency washing

Hybridization이 끝난 chip은 low stringency solution(2 \times SSC, 0.1% SDS), high stringency solution(0.2 \times SSC, 0.1% SDS)으로 각각 4 분간 세척한 뒤 0.1 \times SSC로 4 분간 2 회 세척하고 증류수로 1 분간 3 회 세척하고 600 rpm에서 7 분간 spin dry하였다.

6) Image scanning 및 data processing

Washing을 마친 chip은 GenePix4000B axon scanner를 사용하여 hybridization 이미지와 Cy3/Cy5 ratio 값을 얻었다. 얻어진 값은 Stanford university의 database(<http://genome-www5.stanford.edu>)와 연계하여 유전자의 기본 정보를 얻었다.

7) Clustering 분석과 유전자 기능 분석

유전자 발현의 유연관계와 clustering은 Baylor College of Medicine에서 제공하는 DNA chip 유전자 발현 통계처리 program인 Clusfavor 6.0(Cluster and Factor Analysis with Varimax Orthogonal Rotation)의 centroid method로 분석하여 cluster와 Tree image를 만들었다³⁻⁴⁾. 작성된 cluster는 principal component analysis(PCA)로 주 요인이 되는 유전자를 선정하였다.

건선 환자의 건선 환부와 대칭면의 정상 부위에 존재하는 mRNA의 profile을 기준으로 환부의 mRNA profile을 비교하였다. 유전자 분석 시 spot 오류 값과 발현량이 0.5 이상과 2.0 이하 사이 값은 유의성이 없는 값으로 선정하여 clustering 시 삭제하였다. 선별된 유전자들은 clustering과정을 수행하였고, principal component analysis를 실시하였다. 최종적으로 선정된 유전자들은 Genebank 및 Online Mendelian Inheritance in Man(OMIM, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM) database를 기본으로 하여 기능을 유추하였다.

실험 성적

1. Probe hybridization과 data processing

건선 환자로부터 얻은 RNA는 양적으로 제한되어 있어 직접 microarray에 적용하기에는 부족하였다. 이를 극복하기 위해 1 µg의 total RNA로부터 double-strand의 cDNA를 합성하였으며, 이로부터 in vitro transcription 방법으로 DNA chip에 사용할 충분한 RNA를 확보하였다. 증폭된 RNA는 Cy3와 Cy5로 각각 표지하여 hybridization된 결과를 얻었고 chip scanning 과정 시 histogram을 보며 형광 값을 normalization하였다(data not shown).

2. 유전자의 clustering analysis

2명의 건선환자 조직을 유전자 분석을 하였는데, 복용 전·후의 건선 및 대칭 정상 조직의 유전자 발현량을 구한 후 각각 2배 이상, 0.5배 이하의 발현량을 보이는 유전자를 선별하였다. 선별된 유전자는 clustering을 하여 54개 유전자를 최종 선정하였고 이는 principal component analysis를 하여 factor 값을 구했다(Fig. 1).

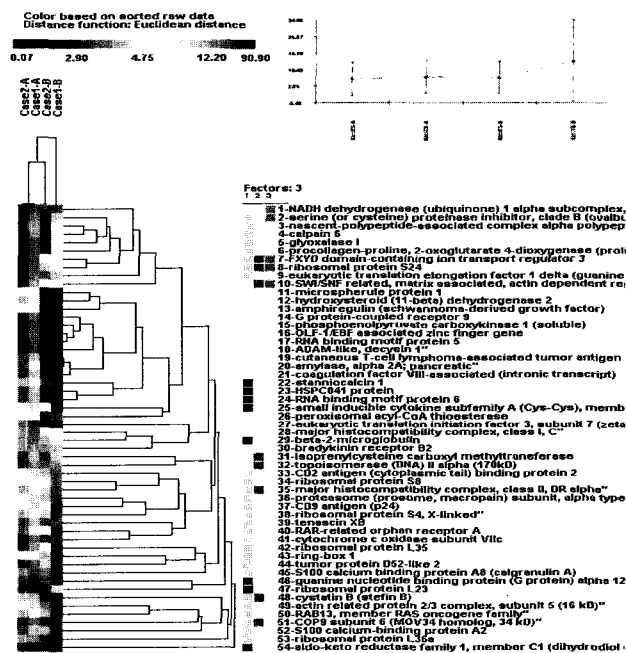


Fig. 1. Tree-view image by clustering analysis. After clustering analysis, 54 genes were finally selected, clustering image showed close correlation of gene expression in each case before(B) and after(A) treatment.

3. 기존 건선 관련 유전자 위치와 비교

2002년 10월 현재까지 환자 가족에서 linkage analysis를 통하여 건선질환 유관 유전자 위치를 OMIM database와 Bowcock 등³⁾의 genome-wide scan에 나타난 내용을 정리하면 54개 관련 유전자를 찾을 수 있었다.

Table 2은 본 실험에서 clustering한 유전자가 기존 건선 관련 유전자 후보와 염색체상 동일 위치에 해당하는 것을 표시하였다. 선정된 54개 유전자 중에서 37개 유전자가 기존의 발표된 건선 관련 유전자와 위치가 동일하였다. 이는 clustering한 유전자 중 68.5%가 일치하는 것이다.

Table 2. The genes that locate within psoriasis susceptibility locus

ID	Gene name	location
AA844818	Amylase, alpha 2A; pancreatic	1p21
AA683050	Ribosomal protein S8	1p34.1-p32
AA487020	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	1p36.21
AA086471	S100 calcium binding protein A8(calgranulin A)	1q21
AA458884	S100 calcium-binding protein A2	1q21
AI376502	RAB13, member RAS oncogene family	1q21.2
AA068428	NADH dehydrogenase(ubiquinone) 1 alpha	2q37.3
H50677	RNA binding motif protein 6	3p21.3
W73892	RNA binding motif protein 5	3p21.3
AA857163	Amphiregulin(schwannoma-derived growth factor)	4q13-q21
W49522	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase,	5q31
AA464246	MHC, class I, C	6p21.3
R47979	MHC, class II, DR alpha	6p21.3
T58430	Tenascin XB	6p21.3
AA136710	Glyoxalase I	6p21.3-p21.1
AA410517	Serine proteinase inhibitor, clade B, member 6	6p25
AI969825	T-cell lymphoma-associated tumor antigen se20-4	7
AA485431	Guanine nucleotide binding protein(G protein) alpha 12	7p22-p21
AA101072	HSPC041 protein	8p11.1
AI921121	ADAM-like, decysin 1/disintegrin protease	8p21.2
AA085319	Stanniocalcin 1	8p21-p11.2
AA488979	Microsphereule protein 1	12p11.1
AA412053	CD9 antigen(p24)	12p13.3
AA664241	Nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	12q23-q24.1
AA194043	Bradykinin receptor B2	14q32.1-q32.2
AW005514	CD2 antigen(cytoplasmic tail) binding protein 2	16p12.1
AI140795	OLF-1/EBF associated zinc finger gene	16q12
AI972799	Ribosomal protein L23	17q
AA504348	Topoisomerase(DNA) II alpha(170kD)	17q21-q22
AA478436	SWI/SNF related, matrix associated	17q23-q24
AA489523	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta	19p13.13
AA447674	Peroxisomal acyl-CoA thioesterase	20q12-q13.1
R06254	Tumor protein D52-like 2	20q13.2-q13.3
AA405731	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1(soluble)	20q13.31
AA863149	Proteasome(prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	20q13.33
H22919	Cystatin B(stefin B)	21q22.3
AA463924	Coagulation factor VIII-associated (intronic transcript)	Xq28

4. Clustering별 grouping

선정된 54개 유전자에서 clustering한 tree 구조를 볼 수 있는데(Fig. 1), 이 tree의 구조상을 기준으로 아홉 group으로 나누었다. group I은 No. 1에서 10까지이며, group II는 11에서 26, group III은 27에서 30, group IV는 31에서 41, group V는 42에서 45, group VI은 46에서 47, group VII은 48에서 52, group VIII은 53, group IX은 54로 각각 분류를 하면, Group I, IV, V, VII, VIII은 복용 후 발현량이 감소한 group이고 Group II, III, V, IX는 복용 후 발현량이 증가한 group이다.

Group I은 복용 전 발현량(이하 발현량 생략)이 2 이상에서 복용 후 2 이상 중 감소한 group으로 10개 유전자로 구성되어 있으며 이 중 기존 건선관련 유전자 위치에 해당하는 유전자가 7개이며, Group II는 복용 전 대부분 0.5 이하에서 복용 후 2 이상으로 증가한 group으로 16개 유전자로 구성되어 있으며 이 중 기존 건선관련 유전자 위치에 해당하는 유전자가 13개이다. Group III은 복용 전 2 이상에서 복용 후 10 이상으로 증가한

group으로 4개 유전자로 구성되어 있으며 이 중 기존 건선 관련 유전자 위치에 해당하는 유전자가 2개이며, Group IV는 복용 전 3 이상(대부분 10 이상)에서 복용 후 2 이상으로 감소한 group으로 11개 유전자로 구성되어 있으며 이 중 기존 건선관련 유전자 위치에 해당하는 유전자가 8개이다. Group V는 복용 전 4 이상(대부분 20 전후)에서 복용 후 2 이상으로 감소한 group으로 4개 유전자로 구성되어 있으며 이 중 기존 건선관련 유전자 위치에 해당하는 유전자가 2개이며, Group VI는 복용 후 20 이상으로 증가한 group으로 2개 유전자로 구성되어 있으며 이 중 기존 건선관련 유전자 위치에 해당하는 유전자가 2개이며, Group VII은 복용 전 7 이상에서 복용 후 2 이상으로 감소한 group으로 5개 유전자로 구성되어 있으며 이 중 기존 건선관련 유전자 위치에 해당하는 유전자가 3개이다. Group VIII은 복용 전 21 이상에서 복용 후 10 이상으로 감소한 group이며 Group IX는 복용 전 26 이상에서 복용 후 56 이상으로 증가한 group이고 Group VIII과 IX는 각 1개 유전자로 구성되어 있다.

Table 3. The changes in expression in levels of functional group-1

function	gene name	ratio
Skin development	S100 calcium binding protein A2	0.22
	S100 calcium binding protein A8	0.69
	Amphiregulin(AREG)	11.51
Immune system	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha(HLA-DRA)	0.49
	Major histocompatibility complex, class I, C(HLA-C)	2.22
	Beta-2-microglobulin(B2M)	1.87
	T-cell, immune regulator 1(TCIRG1: A1359884) C2	14.51
Transcription factor	Topoisomerase(DNA) II alpha 170kDa(TOP2A)	0.28
	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2(SMARCD2)	0.5
	OLF-1/EBF associated zinc finger gene(OAZ)	8.1
	APEX nuclease(apurinic/apyrimidinic endonuclease) 2(APEX2: AW028935) C2	173.39
Protein cycling	ribosomal protein L44	0.31
	ribosomal protein L35	0.35
	ribosomal protein S4 X-linked	0.42
	ribosomal protein S8	0.63
	ribosomal protein S24	0.55
	ribosomal protein L23	2.22
	Cystatin B(CSTB)	0.26
	Ring box 1(RBX 1)	0.37
	COP9 subunit 6	0.08
	Serine(or cysteine) proteinase inhibitor, clade B(ovalbumin), member 6(SERPINB6)	0.84
	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 7(zeta, 66/67kD)(EIF3S7)	7.2
	Cullin 1(CUL1: AA486790) C2	3.87
	Ubiquitin specific protease 25(AA479313) C2	8.64

5. Principal Component Analysis

Clustering하여 선정된 54개 유전자를 다시 주요인 분석(Principal Component Analysis, PCA)을 하여 factor 값을 얻었다. Factor 값이 높으면 주요인 가능성이 높은 것이다. factor 1, 2, 3 중 factor 3에 해당하는 유전자는 No. 1, 2, 7, 8, 10으로 다음과 같다(Fig. 1).

- ① NADH dehydrogenase(ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10(42kD),
- ② serine(or cysteine) proteinase inhibitor, clade B(ovalbumin), member 6,
- ③ FXFD domain-containing ion transport regulator 3,
- ④ ribosomal protein S24 그리고
- ⑤ SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2의 유전자들이 factor 3에 해당되었다.

Table 4. The changes in expression in levels of functional group-2

function	gene name	ratio
Signal transduction	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase(CMT)	0.36
	Guanine nucleotide binding protein(G protein) alpha 12(GNA12)	111.64
	G protein-coupled receptor 9(CXCR3)	22.15
Apoptosis	Ribonucleotide reductase M2 B(TP53 inducible)(RRM2B: AA495950) C2	68.75
	PRKC, apoptosis, WT1, regulator(PAWR: A1984797) C2	9.95
ETC	NADH dehydrogenase(ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa(NDUFA10)	0.78
	FXFD domain containing ion transport regulator 3(FXYD3)	0.54
	Tenascin XB(TNXB)	0.58
	Bradykinin receptor B2(BDKRB2)	2.15
	Aldo-keto reductase family 1, member C1(dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha(3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase) (AKR1C1)	1.84
	Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4(FACL4: AA633818) C2	14.66
	Matrix Gla protein(MGP: AA155913) C2	36.19
	Annexin A6(AA872001) C2	6.84

6. 유전자의 기능별 Grouping

유전자의 선별 기준은 복용 전 발현량 기준을 2.0 이상, 0.5 이하로 하여 분석하여 54개 유전자를 선정하였는데, 이 중 주요인 분석에서 factor값이 높은 유전자를 위주로 기능별 구분을 하였다(Table 3, 4). 또, 복용 전 발현량 기준을 1.5 이상, 0.75 이하로 조정했을 경우에는 186개의 유전자를 clustering할 수 있었다(data not shown). 그 중에서도 factor 값이 높으면서 주목할 만한 유전자들을 추가로 열거하였으며 이 경우는 문장 말미에 Clustering 2라는 의미로 'C2'라는 표시를 하였다.

복용 전에서 복용 후 발현량의 차이는 Case 1의 복용 전·후 대비와 Case 2의 복용 전·후 대비의 평균값으로 표현하였다.

고 찰

현재까지 건선의 원인은 정확히 밝혀지지 않았으나 유전적 요인, HLA 복합체, 면역학적 요인, 표피 운동성의 이상, 각질형성세포(keratinocyte) 분화의 이상, 생화학적 요인, 암 유전자, 眞皮 血管의 異常, 신경 펩티드, 약화 혹은 유발 요인 등으로 분류되고 있으며, 그 외 섬유모세포, 비만세포 및 각질형성세포의 증식과 분화에 대한 신호전달 기전의 이상 등의 다양한 요인들이 관여할 것으로 추정되고 있다⁶⁻⁸⁾. 최근에는 각질형성세포를 조절하는 fibroblast의 역할⁹⁻¹⁰⁾과 apoptosis 대사 기전장애 그리고 T cell의 자가면역 조절장애¹¹⁻¹³⁾로 인식되고 있어 전신적인 면역기

전의 이상이 제시되고 있다.

OMIM에 보면, 환자 가족 linkage analysis에 나타난 건선질환 유관 유전자 위치, Psoriasis susceptibility(PSORS) loci는 6p21.3의 PSORS1, 17q의 PSORS2, 4q의 PSORS3, 1cen-q21의 PSORS4, 3q21의 PSORS5, 19p의 PSORS6, 1p의 PSORS7의 7곳이 선정되어 있으며, 추가 건선 관련 유전자 위치를 합하면 56개 유전자의 연관위치가 정리되었다¹⁴⁾.

본 실험에서 최종적으로 선정된 54개 유전자는 기존 가계도 분석을 통해 결정된 psoriasis locus와 37개가 동일한 locus에 위치하고 있었다. 이 비율은 이전의 유전학적 정보를 바탕으로 추측한 loci와 실제 건선 병변에서 발현되는 유전자 그룹이 연관되어 있음을 의미하는 것이다. 구체적으로 psoriasis locus와 DNA chip 결과가 일치하는 부분의 예를 들면 다음과 같다.

Major histocompatibility complex(MHC) region이 건선관련 유전자임을 입증하는 많은 문헌들이 발표되었는데, Ahnini 등¹⁵⁾은 HLA-C(Human leukocyte antigen-C) locus가 건선 유발 유전자와 관련이 깊다고 하였고, Capon 등¹⁶⁾은 HLA-C 및 1q21 위치가 건선과 연관성이 있음을 주장하였다. 본 실험에서 MHC class I, C(HLA-C), MHC class II, DR alpha(HLA-DRA) 등의 유전자가 clustering에서 선정되었으며 6p21.3 지역에 MHC 이외에 tenascin XB와 glyoxalase I 등의 유전자가 있었다. 1q21 지역에서는 S100 calcium binding protein A8(calgranulin A), S100 calcium-binding protein A2 그리고 RAB13, member RAS oncogene family 등의 유전자가 clustering에서 선정되었다. S100 calcium binding protein A2와 A8은 Bowcock A 등⁵⁾의 gene expression study에서 건선질환에서 가장 높은 수준으로 발현된 유전자로 표현되었다. 본 실험에서 4q13-21에 위치한 amphiregulin이 발현하였는데, Cook 등¹⁷⁾의 조사에서는 keratinocyte EGF(Epidermal growth factor) receptor-ligand system이 psoriatic inflammation에 연관이 되어있으며 epidermal의 AREG의 이상 발현은 psoriatic lesion의 발전과 증식에 중요한 단계라고 하였다. 그리고 Bowcock 등⁵⁾이 genome-wide scan을 통하여 처음으로 14q31-32를 건선 연관 지역으로 발표하였는데 본 실험에서도 같은 위치에 brakinin receptor B2가 발현하였다. OMIM에 나와있는 psoriasis에 관련 인자 중, Crohn's disease에 중요인자로 발현되는 부위가 chromosome 16q12에 있음이 보고되었으며¹⁸⁾ 건선(Psoriasis)도 Crohn's disease나 rheumatoid arthritis와 같은 immunological diseases로 인지되는 것¹⁰⁾을 살펴보면 이 영역에 해당하는 OLF-1/EBF associated zinc finger gene(OAZ)과 CD2 antigen binding protein 2도 건선 유관 유전자 locus에 관련되어 있다.

본 실험에서의 건선 조직 유전자 발현조사에서 clustering하여 나온 54개의 유전자들이 linkage analysis에서 확인된 psoriasis susceptibility loci와 68.5%의 높은 수준으로 동일시되며, 기존의 large-scale gene expression study⁹⁾와 일치하는 바가 있다. 따라서 기존에 알려져 있는 psoriasis linkage gene들의 해당 locus가 본 실험에서 분석한 유전자들의 locus와 동일하고 발현량의 변화가 있으므로 한약제에 의한 건선 치료 기전은 건선 특이 유전자의 발현을 조절함으로써 이루어진다고 사료된다.

결 론

加味潤膚飲을 복용하여 환자를 치료하는 과정에서 건선의 유전자 발현과 그 기전을 이해하기 위해 DNA chip을 이용하여 복용 전·후 유전자 발현을 비교한 결과는 다음과 같았다.

Clustering하여 분석한 결과, 건선부위 keratinocyte 유전자 발현은 복용 후 개체적 차이가 동일한 pattern으로 나타났다. Clustering한 유전자 locus는 기존의 발표된 건선 관련 유전자 locus와 68.5% 동일하였다. Skin development와 protein 합성에 관계된 S100 calcium binding protein A2, A8 및 ribosomal protein 등 유전자들의 발현량이 감소하였다. Apoptosis에 관련된 p53-inducible ribonucleotide reductase s(RRM2B)와 PRKC, apoptosis, WT1, regulator(PAWR), 그리고 G protein 관련 유전자들의 발현량이 증가하였다. Ubiquitin에 관계된 cullin 1과 ubiquitin specific protease 25 등 유전자들의 발현량이 증가하였다. T cell 면역 반응에서 유전자 발현량이 MHC class I에서는 증가하였고 MHC class II에서는 감소하였다. Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4와 matrix Gla protein 등 lipid와 기질형성 유전자 발현량은 증가하였다.

이러한 결과는 한약제가 건선 관련 유전자 발현을 조절하고, 건선에서 나타나는 keratinocyte 이상증식을 apoptosis 관련 유전자들의 조절 과정을 통해 억제하여 치료한다고 사료된다.

참고문헌

1. Kenneth A, Arndt K, Bowers E. Manual of Dermatologic therapeutics with essentials diagnosis, Sixth ed, A Wolter Kluwer Company, pp. 255-258.
2. Wang E, Miller DL, Ohnmacht AG, Liu TE, Marincola MF. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. Nat Biotechnol. 18: 457-459. 2000.
3. Peterson LE. Software Report: CLUSFAVOR 5.0: hierarchical cluster and principal component analysis of microarray-based transcriptional profiles, Genome Biology. 3(7): 1-8, 2002.
4. Peterson LE, Lau K. Observation of intermittency in gene expression on cDNA microarrays, Genome Biology. 3(7): preprint version, 2002.
5. Bowcock AM, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K, Catier J, Fernandez-Vina MA, Menter A. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies, Hum Mol Genet. 10(17): 1793-805, 2001.
6. 윤재일. 건선(건선 아트라스), 고려의학, 서울, p.9,12,29-54, 1996.
7. 윤재일. 윤재일박사의 건선클리닉, 사계절, 서울, p. 12, pp. 22-23, 81-83, 1998.
8. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학(개정4판), 麗文閣, 서울, pp. 163-164, 221-230, 2002.

9. Saiag P, Coulomb B, Lebreton C, Bell E, Dubertret L. Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro, *Science*. 230: 669-672, 1985.
10. Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation, *Trends Cell Biol.* 11(4): 143-6, 2001.
11. Asadullah K, Volk HD, Sterry W. Novel immunotherapies for psoriasis, *Trends Immunol.* 23(1): 47-53. 2002.
12. Nickoloff BJ. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe?, *J Clin Invest.* 104(9): 1161-4, 1999.
13. Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations, *Immunol Today.* 20(1): 40-6, 1999.
14. Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W, Westphal E, Guo SW, Christophers E, Voorhees JJ, Elder JT. Evidence for two psoriasis susceptibility loci(HLA and 17q) and two novel candidate regions(16q and 20p) by genome-wide scan, *Hum Mol Genet.* 6: 1349-1356, 1997.
15. Ahnini RT, Camp NJ, Cork MJ, Mee JB, Keohane SG, Duff GW, di Giovine FS. Novel genetic association between the corneodesmosin (MHC 5) gene and susceptibility to psoriasis, *Hum Molec Genet.* 8: 1135-1140, 1999.
16. Capon F, Semprini S, Dallapiccola B, Novelli G. Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21, *Am J Hum Genet.* 65: 1798-1800, 1999.
17. Cook PW, Piepkorn M, Clegg CH, Plowman GD, DeMay JM, Brown JR, Pittelkow MR. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype, *J Clin Invest.* 100: 2286-2294, 1997.
18. Zouali H, Chamaillard M, Lesage S, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, Montague S, Gassull M, Christensen S, Finkel Y, Gower-Rousseau C, Modigliani R, Macry J, Selinger-Leneman H, Thomas G, Hugot JP. Genetic refinement and physical mapping of a chromosome 16q candidate region for inflammatory bowel disease, *Europ J Hum Genet.* 9: 731-742, 2001.