대한한의학회지 제21권 제1호(2000년 3월)
J Korean Oriental Med 2000;21(1):53-61

원 저

茵陳분획물이 인체간세포의 TGFβ1-induced apoptosis에 미치는 영향

이 지 현, 이 장 훈, 우 홍 정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effects of Five Fractions of Artemisia capillaris THUNB on TGFβ1-induced Apoptosis in HepG2 Cells

Ji-Hyeon Lee, Jang-Hoon Lee, and Hong-Jung Woo

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Objectives : This study was carried out to examine the effect of five fractions of aqueous extract from Artemisia capillaris THUNB(ACT). on TGF,1-induced apoptosis, cell viability, cell cycle progression and mRNA expression of apoptosis-related genes in human hepatocyte cell line HepG2.

Methods : This study employed Tryphan blue exclusion assay, DNA fragmentation assay, Cpp32 protease activity assay and Quantitative RT-PCR analysis.

Results : In the Tryphan blue exclusion assay, the butanol fraction of ACT with TGFβ,1 showed magnificent (Nice word, ut is it appropriate in a medical abstract?) viability and the H2O fraction of ACT with TGFβ,1 also showed higher viability than only TGFβ,1-treated group.

DNA fragmentation assay showed that the butanol fraction and the H2O fraction carried inhibitory effects on apoptosis induction, with the butanol fraction displaying greater effects. The Cpp32 protease activity assay showed that the butanol fraction decreased Cpp32 protease activity. The H2O fraction of ACT had no significant effect on the Cpp32 protease activity.

Quantitative RT-PCR showed that the butanol fraction suppressed Bax, p15/INK4B, p21/Waf1, PAI-1 and increased Bcl-2 gene.

Conclusions : The daia shows that butanol fraction of ACT increases the hepatocyte viability and has the hepatocellular protective effect by the suppression of TGFβ,1 induced-apoptosis through gene regulation. (J Korean Oriental Med 2000;21(1):53-61)

Key Words: Artemisia capillaris THUNB(ACT)., TGFβ1, Apoptosis, Gene regulation

서 론

우리나라는 바이러스성 간염의 이환율이 상당히 높고, 특히 B형 간염 바이러스 보유율은 약 6-7%에 이르고 C형 간염 바이러스 또한 B형에 이어 간질환의 주요 원인을 차지하고 있다[1]. 바이러스성 간염은 흔히 만성화되고 간경변증이나 간암으로 진행하는데 이러한 각종 간질환은 우리나라 40-50대 사망률을 높이는 주요원인이 되고 있다. 따라서 이러한 바이러스성 간질환은 개인이나 가정은 물론 국민보건상 시급히 해결해야 하는 사회적 문제로 인식되고 있다.

바이러스에 의한 세포손상은 직접적인 손상보다는 바이러스에 감염되었을 때 발생되는 인체면역응답의 결과가 주요기전이 되는데[2], 바이러스에 감염된 간세포가 항원을 제시하면 T 세포와 natural killer 세포가 공격하거나 보체계의 활성화 등으로 인해 세포가 제거된다. 이러한 감염세포의 제거기전은 아직까지 명확하지는 않으나 세포독성 T 세포를 중심으로 하는 apoptosis가 제시되고 있다. Apoptosis는 DNA의 분절화에 의한 세포자연사로 다세포 생물의 발생과정과 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데, 바이러스로 인한 간세포손상에는 Fas 및 TGFβ1 등을 매개로 하는 apoptosis가 주요 기전으로서 주목받고 있다[3-4].

바이러스성 간염의 치료는 바이러스 감염의 예방, 바이러스 감염시 만성화의 방지, 만성간염의 경우 간경변증 혹은 간세포암으로의 진행을 지체시키기 위한 치료, 기타 합병증들에 대한 치료 등을 포함한다. 현재까지 알려진 치료법에는 항바이러스제, 면역조절제, 그리고 간기능을 도와주는 보조적인 역할을 하는 약물들을 이용한 치료 등이 있으나 간염 자체의 진행을 막는 만족스런 치료방법은 제시되지 못하고 있는 실정이다. 최근의 연구경향은 항바

· 접수 : 2000년 4월 12일 · 수정 : 4월28일 · 채택 : 5월 16일
· 교신저자 : 이장훈, 서울시 동대문구 회기동 1 경희의료원 한방병원 간계내과 (Tel : 02-958-9115)

이러스 요법과 더불어 간세포 보호작용을 하는 약물투여 방법이 연구되고 있다[5].

한의학문헌 중 바이러스성 간질환과 관련된 증후들은 주로 黃疸門에 자세히 기술되어 있다. 張仲景은 傷寒論에서 황달에 대한 임상경과, 예후 등을 설명하고, 치료방으로 茵陳五苓散을 제시하였다. 이후 茵陳은 淸熱利濕을 治法의 근간으로 하는 바이러스성 간질환의 치료에 대표적인 약물로 사용되어 왔다. 최근에 한약의 간보호효과에 대한 면역학적 · 유전학적 접근이 시도되고 있는데 간세포활성, 세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향을 茵陳四苓散 및 茵陳을 중심으로 하여 유전자 조절 단계에서의 간세포 보호효과를 밝히기 위한 실험이 보고된 바 있다.

저자는 바이러스성 간염 치료의 두가지 방향 중 한약물의 간세포 보호작용을 검증하기 위하여 茵陳의 각 분획물이 TGFβ1을 매개로 한 apoptosis에 미치는 영향을 분자생물학적 방법으로 검증하고자 HepG2 cell을 이용, TGF β1이 유발하는 apoptosis의 정도와 茵陳의 apoptosis 억제효과를 알아보기 위하여 Tryphan blue exclusion assay, DNA fragmentation assay 및 Cpp32 protease activity assay를 시행하였으며, 유전자 발현의 변화를 파악하기 위하여 Quantitative RT-PCR을 시행하여, 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해[6]에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 약물의 내용과 용량은 다음과 같다.

Pharmacognosy Name, Scientific Name and Dose of Injin

Herbs	인진
Pharmacognosy Name	Artemisiae Capillaris Herba
Scientific Name	Artemisia capillaris THUNB.
Dose	615g

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료 615g을 3차증류수 4.8 l 로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 70.6g의 건조추출물을 얻어 11.48%의 수율을 보였다.

2. 방법

1) 유기용매를 이용한 인진성분의 추출

인진 30g을 이용하여, 1차 추출용매인 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, H_2O의 5가지 용매에 녹였다. 그 방법은 우선 sample 30g을 증류수 300ml에 녹인다. 그 후 hexane 200ml를 넣어, 섞고 분리한다. 상층액을 모아 hexane을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 hexane fraction을 얻는다. 물층에 chloroform 200ml을 넣고 분리한다. 하층을 모아 chlorofrom을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 chloroform fraction을 얻는다. 다시 물층에 ethylacetate 200ml를 넣어 분리한다. 상층액을 모아 ethylacetate를 날린다. 남은 부분을 모아 동결건조하여 ethylacetate fraction을 얻는다. 다시 물층에 butanol fraction 200ml를 넣어 분리한다. 상층액을 모아 butanol을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 butanol fraction을 얻는다.

위에서 얻은 각각의 약물을 2차 추출용매인 DMSO, chloroform, butanol, H_2O를 이용하여 다시 녹여서 100㎎/ml의 농도로 stock solution을 제작하였다.

2) 간세포에 대한 약물처리

우선 TGFβ1에 의한 apoptosis를 유도하기 위하여 2ng/ml 및 4ng/ml의 porcine TGFβ1 (R&D)를 약 $5x10^5$/well의 세포에 24, 48, 72 시간 동안 처리한 후 cell death의 정도를 분석하였다. 위의 분석결과를 토대로 이후실험 즉, TGFβ1에 의한 apoptosis에 약물이 미치는 영향을 분석하기 위하여는 4ng/ml의 TGFβ1를 48시간 처리하기로 하였다. 이때 간세포에 처리되는 약물의 최종농도는 1, 10, 100μg/ml로 하였고 48시간이 경과한 후 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 protein, RNA를 추출하였다.

실 험

1. Tryphan blue exclusion assay

농도별, 시간별로 세포에 각각의 약물분획을 처리한 후 세포를 회수하였다. ice-cold PBS (phosphate buffer saline) 0.5ml로 세포 pellet을 suspension하고 이를 tryphan blue solution으로 염색한 후 Hemocytometer를 이용하여 죽은 세포의 개수를 측정하였다.

2. DNA fragmentation assay

약물을 처리하여 각 시기별로 세포를 회수한 후 PBS (phosphate buffer saline)로 2회 세척한다. 2ml의 ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 넣어 세포를 1시간동안 4℃에서 고정한다. PBS로 다시 2회 세척한 후 100μg/ml RNase

와 40㎍/㎖ propidium iodide(PI)의 PBS에서 37℃로 30분간 배양한다. 세포를 회수하여 FACscan을 이용하여 절편입자를 정량한다.

3. Cpp32 protease activity assay

100㎕의 lysis buffer(0.5%NP-40, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl and 50mM Tris, pH7.5)에 세포($7x10^5$ cells)를 용해시킨후 15000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한다. 20㎕의 cell lysate와 180㎕의 reaction buffer(100mM, pH7.5 HEPES, 20% Glycerol, 5mM DTT, 5mM EDTA, and 100㎛M Peptide substrate)에서 37℃에서 배양한다. 405nm에서 ELISA reader를 이용하여 OD(optical density)값의 변화곡선을 얻는다.

4. 정량 RT-PCR

1) RNA의 추출

① GSS solution의 제작

250g의 guanidine isothiocyanate을 293㎖의 3차 증류수에 넣은 후 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6㎖와 10% sarkosyl 26.4㎖를 넣어 65℃에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다.

② Solution D의 제작

GSS solution에 2-mercaptoethanol 을 0.1M의 농도로 넣어 제작하였다.

③ 10^7개의 세포에 solution D 500㎕, 2M sodium acetate(pH4.0) 50㎕를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500㎕, chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 100㎕를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

④ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000㎕를 넣어 -70℃에서 24시간 침전시켰다.

⑤ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA pellete을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30㎕의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

2) cDNA의 제작

① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

Reverse transcriptase buffer	2㎕
Random hexamer (10 pM)	1㎕
AMV-RT (10U/㎕)	1㎕
dNTP (10 pM)	1㎕
RNase inhibitor	0.5㎕
RNA	1㎍

② 혼합용액이 20㎕가 되도록 sterile water를 첨가한 후 42℃에서 15분간 방치하였다.

③ 각 시료에 80㎕의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

3) Primer의 제작

① House keeping gene

GAPDH

: Glyceraldehyde-3-Phosphate

-Dehydrogenase

② TβR-Ⅰ

TβR-Ⅱ

Bax

Bcl-2

Smad2

Smad3

Smad4

p15/INK4B

p21/Waf1

PAI-1

4) Quantitative PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10x amplification buffer	10㎕
Mixture of dNTP (10 pM)	5㎕
GAPDH primer 1 (10 pM)	2㎕
GAPDH primer 2 (10 pM)	2㎕
Template cDNA	4㎕
H_2O	77㎕

② GAPDH primer를 이용하여 다음의 조건으로 36 cycles PCR반응을 시행하였다.

a. First cycle

Denaturation	5 min at 94℃
Annealing	1 min at 59℃
Polymerization	1 min at 72℃

b. Subsequent cycle(34 cycle)

Denaturation	1 min at 94℃
Annealing	1 min at 59℃
Polymerization	1 min at 72℃

c. Last cycle

Denaturation	1 min at 94℃
Annealing	1 min at 59℃
Polymerization	10 min at 72℃

③ PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각

band의 밝기를 정량화하였다.

④ 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 ±20% 내로 정량화하였다.

⑤ 위의 결과를 바탕으로 target 유전자에 대한 PCR 반응을 시행하여 상대적인 정량화를 시행하였다.

Target gene의 PCR조건은 다음과 같다.

Cycle	Denaturation	Annealing	Polymerization
First Subse	5 min at 94℃	1 min at 59℃	1 min at 72℃
-quent	1 min at 94℃	1 min at 59℃	1 min at 72℃
Last	1 min at 94℃	1 min at 59℃	10 min at 72℃

성 적

1. Tryphan blue exclusion assay

우선 TGFβ1에 의한 apoptosis를 확인하기 위해 2ng/ml, 4ng/ml 농도의 TGFβ1을 24, 48, 72시간 3가지로 나누어 처리한 후 Tryphan blue exclusion assay를 시행하였으며 Hemocytometer를 이용하여 dead cell을 측정하였다. 그 결과 정상 대조군(control)과 TGFβ1처리를 한 실험군 중, 실험군에서 간세포의 cell death의 유도가 현저하게 일어나는 것이 확인되었다. 2회 실험 결과의 평균과 표준편차는 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The TGFβ1-induced Apoptosis of HepG2 cells in Tryphan Blue Exclusion Assay (cell count: dead cells, total cells: 500)

TGFβ1	Control	TGFβ1 treated		
		24hr	48hr	72hr
2ng/ml	41±4.2	127±7.1	212±11.3	300±2.8
4ng/ml	44±7.1	164±3.5	258±13.4	319±2.8

이후의 실험에서는 이중에서 4ng/ml의 TGFβ1을 48시간 처리하여 유도되는 apoptosis에 약물이 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 인진의 butanol fraction 및 H_2O fraction이 apoptosis의 억제효과를 가지는 것으로 나타났으며 특히 이러한 효과는 butanol fraction에서 두드러졌다. 2회에 걸친 실험결과의 평균과 표준편차를 표시하면 다음과 같다(Table 2).

2. DNA fragmentation assay

TGFβ1-induced apoptosis에 대한 약물의 효과를 알아보기 위하여, 인진 각 분획물과 TGFβ1(4ng/ml)를 동시에 투여하여 DNA fragmentation assay를 시행하였다. 먼저

Table 2. The Effect of Each Fraction of Artemisia capillaris THUNB(ACT). on TGFβ1-induced Apoptosis of HepG2 cells in Tryphan Blue Exclusion Assay (TGFβ1: 4ng/ml, ACT fractions: 1.0, 10.0, 100.0 μg/ml, Total cells: 500, Cell count: dead cells)

	Con -trol	TGFβ1 only	TGFβ1+ 1.0μg/ml	TGFβ1+ 10.0μg/ml	TGFβ1+ 100.0μg/ml
Hexane	38.5± 3.54	240.0± 4.24	232.0± 1.41	249.5± 6.36	245.5± 13.44
Chloro -form	41.0± 4.24	289.5± 16.26	272.5± 20.51	274.0± 24.04	258.5± 26.16
Ethyl -acetate	33.0± 5.66	283.5± 38.89	267.0± 43.84	275.0± 22.63	260.0± 26.87
Butanol	32.0± 8.49	291.5± 45.96	243.0± 32.53	186.0± 16.97	124.5± 7.78
H_2O	38.0± 2.83	266.0± 32.53	241.0± 22.63	205.5± 23.34	178.0± 14.14

TGFβ1를 4ng/ml의 농도로 6시간 처리하고 인진 각 분획물을 1, 10, 100μg/ml의 농도로 42시간 처리한 후, FAC scan을 시행하였다.

2회 실험 결과, Sub-G1 phase의 apoptotic body가 TGFβ1만 처리한 군에서는 2회의 실험에서 각각 47.3%, 50.6%였는데, butanol fraction을 함께 처리한 군에서는 농도 1.0 μg/ml에서 40.1%, 40.8%를, 농도 10.0μg/ml에서 35.2%, 29.5%를, 농도 100.0μg/ml에서는 25.9%, 24.8%를 보여 농도의존적인 현저한 감소를 보였고, H_2O fraction을 함께 처리한 군에서도 농도 1.0μg/ml에서 42.4%, 40.3%를, 농도 10.0μg/ml에서 38.2%, 35.9%를, 농도 100.0μg/ml에서는 32.8%, 29.6%로 감소되는 양상을 보였다. 2회 실험결과의 평균과 표준편차는 다음과 같다(Table 3).

Table 3. DNA Fragmentation Assay by FACscan (%)

			TGFβ1 +		
	Normal	Control	1.0μg/ml	10.0μg/ml	100.0μg/ml
Hexane	5.80± 0.85	47.20± 0.14	44.951± 0.21	48.40± 1.84	44.45± 0.78
Chloro -form	6.95± 0.50	48.60± 2.26	49.70± 1.41	45.05± 1.20	45.55± 2.19
Ethyl -acetate	6.25± 0.50	49.70± 2.26	50.80± 2.40	49.15± 1.34	46.45± 0.64
Butanol	7.10± 0.14	48.95± 2.33	40.45± 0.50	32.35± 4.03	25.35± 0.78
H_2O	6.75± 0.92	49.90± 2.55	41.35± 1.49	37.05± 1.63	31.20± 2.26

3. Cpp32 protease activity assay

Apoptosis와 연관성이 있는 유전자 Cpp32 protease activity를 측정하였다. 4ng/㎖의 TGFβ1와 인진의 각 분획물 100㎍/㎖를 처리한 후 30분 및 60분 후 2가지의 시간별로 관찰하였다. 2회 실험의 평균과 표준편차를 Table 4에 표시하였다.

Table 4. The Effects of Each Fraction of Artemisia capillaris THUNB(ACT). in Cpp32 Protease Activity Assay

		30mins	60mins
	TGFβ1 only	0.668±0.015	0.770±0.009
TGFβ1	Hexane	0.679±0.011	0.790±0.003
	Chloroform	0.647±0.003	0.779±0.004
	Ethylacetate	0.673±0.006	0.767±0.017
	Butanol	0.650±0.001	0.494±0.008
	H_2O	0.655±0.025	0.705±0.024

Table 4에서 보듯이 인진의 각 분획물 중 butanol fraction에서 Cpp32 protease activity의 저하를 보였다. 다만 이 실험에서는 H_2O fraction에서의 Cpp32 protease activity의 저하는 없었다. 우리는 여기에서 butanol fraction에 의한 Cpp32 protease activity 저하로 FACscan에서 관찰된 apoptosis 억제를 다시 확인하였다. Tryphan blue exclusion assay와 DNA fragmentation assay에서 관찰되었던 H_2O fraction에 의한 apoptosis 억제는 이 실험에서 다시 확인되지 않았다. 이후의 실험에서는 Quantitative RT-PCR을 시행하여 apoptosis와 관련되는 유전자 단계에 약물이 미치는 영향을 확인하였다.

4. Quantitative RT-PCR

지금까지의 결과를 토대로 하여 인진의 butanol fraction으로부터 지속적인 TGFβ1-induced apoptosis에 대한 억제효과가 관찰됨에 따라, TGFβ1(4ng/㎖)과 butanol fraction(10 및 100 ㎍/㎖)을 48시간 처리하여 gene regulation효과를 quantitative RT-PCR을 통하여 분석하였다. 먼저 RNA를 추출하여 cDNA 및 primer를 제작한 후 PCR반응을 시행하고 전기영동을 거쳐 모든 product를 densitometer로 정량화하였다. 동일한 과정을 2회 반복실시하여 재현가능성 높은 일정한 결과를 얻었다. 2회 실험의 평균과 표준편차를 표시하였다(Table 5).

Table 5에서 보듯이 butanol fraction은 유전자 level에서 Bax, p15/INK4B, p21/Waf1, PAI-1을 억제하며, Bcl-2는 증가시켰다. 이외의 TβR-Ⅰ, TβR-Ⅱ, Smad2, Smad3, Smad4에는 큰 영향을 미치지 않았다.

이상을 종합하면, 인진의 butanol fraction이 HepG2 cell의 apoptosis를 gene regulation을 통해 억제하고 있다는 것을 알 수 있다.

Table 5. Quantitative RT-PCR by Densitometry Scanning (gene/GAPDH)

Gene/ GAPDH	Untreated TGF only	Butanol fraction Treated 10㎍/㎖	100㎍/㎖
TβR-Ⅰ	1.277±0.079	1.317±0.008	1.303±0.018
TβR-Ⅱ	1.281±0.069	1.278±0.039	1.294±0.011
Bax	1.393±0.134	0.686±0.009	0.613±0.016
Bcl-2	1.273±0.008	1.946±0.062	2.344±0.123
Smad2	1.122±0.150	1.185±0.095	1.211±0.150
Smad3	1.296±0.021	1.305±0.020	1.165±0.070
Smad4	1.259±0.057	1.320±0.006	1.277±0.015
p15/INK4B	1.855±0.093	0.883±0.025	0.836±0.065
p21/Waf1	1.959±0.078	1.138±0.028	1.109±0.021
PAI-1	3.682±0.324	1.430±0.387	1.041±0.084

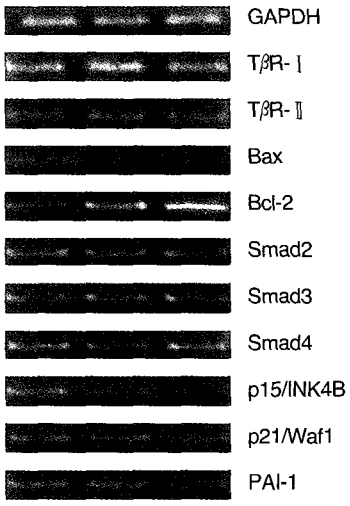

Fig. 1. Gene expression.

2회의 실험 중 두 번째 실험에서 얻은 사진은 다음과 같다(Fig. 1.).

고 찰

韓醫學에서 肝疾患에 대한 內容은 黃疸, 脇痛, 積聚, 鼓脹, 酒傷, 勞倦傷 등의 證候에 수록되어 있다. 이 중 黃疸의 증후는 바이러스성 간질환과 가장 유사하다. A.D. 200년경에 張仲景은 黃疸의 다양한 증후 등을 관찰하였고, 그 치료에 있어서도 茵陳五苓散 등의 處方을 제시하였다[7-8]. 이후 歷代醫家들에 의해 黃疸에 대한 연구가 진행되어 왔으며, 근래에는 바이러스성 간질환에 대한 연구가 계속 보고되고 있다.

우리나라의 경우 간염 바이러스, 특히 B형간염 바이러스에 의한 만성간질환의 이환율이 세계적으로 높은 편이고, 사회적으로 중요한 역할을 담당할 40대에서 간질환으

로 인한 사망률이 가장 높게 나타나 개인은 물론 국가적으로도 중요한 문제가 되고 있다. 만성 간질환과 간경변으로 인한 사망률이 전체 사인 중 5위를 차지하고 있으며, 특히 간암으로 인한 사망률은 인구 10만명당 21.4명(남자 32.6명, 여자 10.0명)으로 세계보건통계연감에 발표된 나라 중 가장 높다[9]. 따라서 바이러스성 간질환 및 만성 간질환에 대한 보다 효율적인 치료대책이 중요과제로 인식되고 있다.

생명체를 구성하는 단위세포의 사망은 괴사(necrosis)의 형태뿐만 아니라 세포의 위축, 염색체의 압축 등의 특징을 가진 새로운 형태인 apoptosis로서도 이루어진다. 이러한 apoptosis가 손상되거나 불필요해진 세포를 생명체가 자발적으로 제거하여 생명체를 보존하기 위한 현상임이 밝혀지면서 apoptosis의 의의를 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[10-11]. 외부작용에 의한 세포의 죽음인 necrosis에서는 죽는 세포는 부피가 커지면서 결국에는 세포가 터지고, 밖으로 분출된 세포질에 의해 염증반응을 일으키는 반면, apoptosis에서는 세포 부피의 축소, 세포막 돌출, membrane-bound apoptotic body의 형성, 핵의 염색질 농축, DNA 단편화 등이 일어나고 죽은세포는 이웃세포의 대식작용에 의해 사라지게 된다.

Apoptosis현상은 세포의 사망기전이므로 세포의 증식, 세포주기 등에 관여하는 유전자와 서로 연관되며 apoptosis를 유발하는 유전자의 기능은 주로 세포막에서 apoptosis를 시작하게 하는 촉매의 역할을 하는데 가장 많이 연구된 것이 Fas와 TGFβ1이다. 이 중 TGFβ1은 상피세포의 성장을 억제하는 것으로 널리 알려져 있는데 간세포, 전립선세포, 자궁상피세포등에서 과발현시키면 apoptosis를 일으킨다. 정상 간세포에서는 발현되지 않으나 apoptosis가 일어나고 있는 간세포나 전암(preneoplastic) 간세포에서는 발현되는 점 등으로 보아 생리학적 조절과정에서는 간세포이외의 세포에서 발현되며 병적상태에서는 간세포 자체에서 발현되어 apoptosis를 유발하는 것으로 추측된다[12].

Transforming growth factorβ(TGFβ)는 원래 그 이름의 의미대로 세포의 형질전환(transformation)을 촉진하는 인자의 하나로서 발견되었다. 1980년에 Sporn과 Todaro는 Moloney sarcoma virus에 의해 형질이 전환된 mouse 3T3 세포는 배양상청액 중에 증식인자를 분비하는데, 이 증식인자가 rat NRK세포와 같은 비악성 세포를 형질전환시키는 능력을 갖고 있다는 사실을 발견했다. 이 sarcoma 증식인자의 NRK세포를 형질전환시키는 생리활성은 TGFα와 TGFβ라고 이름붙여진 두개의 전혀 다른 단백질의 혼합된 작용의 결과인 것이 후에 밝혀졌다. TGFα는 EGF(상피세포 성장인자)수용체에 결합하는 EGF와 유사한 물질인 것에 반해, TGFβ는 많은 정상세포와 조직에서 분비되는 분자량 25,000의 homodimer로 혈소판, 뼈, 심장, 간, 신장 등에 많이 들어있는 새로운 형태의 증식인자로 밝혀졌다[13]. 이후 TGFβ는 여러종류의 상피세포의 성장을 촉진시키는 성장인자보다는 강력한 억제인자이고 collagen합성의 강력한 촉진인자이며, T-임파구와 B-임파구 활성의 억제 작용을 하는 등 다양한 생리활성을 가지고 있다는 사실이 알려져 원래의 이름인 TGFβ는 잘못 붙여진 이름이라는 사실이 명백하게 되었다. 사람에서는 TGFβ1,2,3의 세가지 이형(isoform)이 알려져 있으며 TGFβ family에 속하는 다른 단백질로 뇌하수체 전엽에서 FSH(난포자극 호르몬)의 분비를 억제하는 인자로서 난포핵으로부터 정제된 물질인 Inhibin과, FSH의 분비를 촉진하는 Activin이 1986년에 밝혀졌다. 또한 발생에 관여하는 여러가지 생리활성 물질이 TGFβ family에 속하는 것으로 알려졌다. 이 중 포유류에서 가장 풍부한 이형은 TGFβ1으로서 혈소판, 비장, 골 등에서 다량 분비된다. 최근에는 유전자 재조합형 TGFβ가 제조되고 있으며 임상응용의 주된 역할을 할 것으로 기대된다[14]. TGFβ는 생체내 여러조직에 널리 산재하고 그 누클레오티드 서열(nucleotide sequence)이 가장 원시적인 척추동물에 이르기까지 엄격히 보존되어 있는 점 등이 TGFβ가 정상적으로 체내에서 필수적 역할을 수행함을 시사한다. 즉, TGFβ는 대표적인 다기능 성장인자로 알려져 있는데 그중에서 특히 세포의 증식 및 분화의 조절이나 세포외 기질의 합성에 중요한 역할을 한다. 실제로 연조직(soft tissue)이나 골조직의 재생 및 손상된 심근의 재생에 관여함이 잘 알려져 있고 또한 간경변, 폐섬유화, 류마티스성 관절염을 비롯한 각종 자가 면역성 질환이나 동맥경화증, 사구체 신염 등 섬유화를 동반하는 여러 만성 염증성 질환의 병인론에도 관련됨이 보고되고 있어 그 자체 혹은 중화항체(neutralizing antibodies)를 이용함으로써 전술한 여러 질환들의 치료에 임상적으로 응용될 수 있는 가능성이 시사되고 있다[14].

TGFβ의 생물학적 작용은 제1형(Type Ⅰ) 및 제2형(Type Ⅱ) receptor에 의해 일어나는데 이들은 모두 transmembrane serine/threonine kinase들로서 heteromeric receptor complex를 형성한다. Ligand로부터 target gene에 이르는 TGFβ signaling pathway는 우선 receptor와 결합하는 것으로부터 시작된다[15-16].

Smads의 발견은 dpp유전자 분석에서 비롯되었으며 1997년경부터 TGFβ signal이 매개되는 세포내 경로에 Smad family의 역할이 활발히 연구되기 시작하였다. TGFβ family receptor에 TGFβ가 결합하여 complex를 형성하면 세포질내의 Smad는 인산화되며 다른 Smad와

결합하여 작용한다. 그 종류는 Smad1에서 Smad7까지 여러종류가 있으며 각각 구조 및 신호전달체계에 특이성을 가지고 있다. 그중 Smad2,3은 TβR-Ⅰ과 ActR-ⅠB를 통해 activin/Vg1과 TGFβ response를 매개한다. Smad4는 activin/Vg1과 TGFβ뿐만 아니라 BMP signal 등 모두에 관여한다. 결국 Smad는 세포질에서 서로 결합, 인산화된 후 핵내로 이동하여 DNA 결합 단백질과 연결, gene transcription을 활성화시키는 signaling mediator로서 역할을 한다[17-18].

핵내에 존재하며 TGFβ1 signal에 의해 최종적으로 조절받는 것으로 알려진 p15/INK4B, p21/Waf1, PAI-1등의 유전자가 있다. 이 중 p21단백질은 Waf1, Cap20, Cip1 등으로도 알려져 있는데 노화된 세포에서 그 양이 증가하므로 세포분열을 억제하는 것으로 알려져 있다[19]. p15-INK4B 도 G1 cyclin-Cdks의 activity를 조절하는 Cdk inhibitor의 일종으로, Human keratinocytes의 경우 TGFβ를 처리하였을 경우 p21/Waf1 와 p15/INK4B의 양이 transcription level에서 증가하는데 이들은 G1 cyclin-Cdk와 결합을 하여 세포분열을 막으며 p15/INK4B의 경우 cyclin D-Cdk와 결합을 하여 Cdk activity를 inhibition한다. PAI-Ⅰ은 Plasminogen activator inhibitor-Ⅰ으로 TGFβ1에 반응하여 그 mRNA 발현이 증가하는 것으로 잘 알려져 있으며 TGFβ1 작용여부의 지표로 사용되고 있다.

본 실험에 사용된 茵陳은 茵陳五苓散의 主藥이며, 현재 임상에서 만성간질환의 치료에 淸熱利濕을 목표로 널리 사용되고 있다. 茵陳은 국화과의 여러해살이풀 사철쑥 Artemisia capillaris THUNB.의 어린싹이며, 性味는 苦微寒하고 淸熱, 利濕, 退黃하여, 급성간염, 만성간염, 간경변증, 간암 등에 널리 사용되고 있으며, 담낭염, 담낭결석 등의 질환에도 사용되고 있다. 약리적으로 capillene, capillone, capilline, folic acid, dimethyl-aescaletin, caffeic acid, β-pinine 등의 성분을 함유하고 있다. 담즙분비 촉진 등 이담작용을 가지고 있으며, in vitro상에서 황색포도구균, 고초균, 티푸스균 등을 억제하는데, 煎汁에서는 人形結核菌을 완전히 억제하는 작용이 있다. 또 ethylalcohol 추출물은 influenza virus PR3를 강력히 억제하는 작용을 가지고 있고, 400만배의 희석액으로도 성홍색백선균의 발육을 억제하는 항진균작용을 가지고 있다. 그리고 혈관벽으로의 지질침착을 방지하며 동물실험상 혈압을 강하하는 작용이 있고, 精油는 장관운동을 억제하는 역할을 한다[20-21].

근래에 茵陳을 주약으로 구성한 약물로 간기능 개선효과를 관찰한 실험논문이 계속 보고되어 왔으며 최근에 와서는 한약의 간보호효과에 대한 면역학적 · 유전학적 접근이 시도되고 있는데, 洪[22]은 茵陳淸肝湯加味方이 Etoposide에 손상된 간세포 보호효과 및 Cpp32, Fas, Bcl-2의 발현을 억제하여 apoptosis를 억제하는 효과가 있음을 보고하였고, 姜[23]은 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향을, 表[24]는 茵陳四 散이 간세포 활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 연구하여 유의성있는 결과를 얻은 바 있다. 인진사령산 및 인진 분획물의 DNA-induced apoptosis, Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향과 간세포보호작용에 대한 실험연구에 이어 저자는 인진분획물이 TGFβ1-induced apoptosis에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 실험에서 Tryphan blue exclusion assay결과 TGFβ1 처리군은 대조군에 비하여 농도 및 처리시간별로 cell deah가 의미있게 증가하였다. 이후 인진의 각 분획물이 간세포에서 TGFβ1이 유도하는 apoptosis를 control하는 기전을 확인하기위해 DNA fragmentation assay를 실시한 결과, TGFβ1만 처리한 군에 비해 인진의 butanol fraction을 함께 처리한 군, H_2O fraction을 함께 처리한 군에서 sub-G1 phase의 apoptotic body의 비율이 약물 분획에 대해 농도의존적인 감소를 보였으며 특히 butanol fraction을 함께 처리한 군에서 그 감소가 현저함을 확인하였다.

Cpp32의 면역반응은 간세포, 골수, 기관지 상피세포, 집합관, medulla, cartilage의 chondrocyte에서 높게 나타나며, Cpp32가 결여된 쥐의 뇌에서는 apoptosis가 유발되지 않아 apoptosis에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서 Cpp32 protease의 활성도를 측정한 결과 인진의 butanol fraction을 함께 처리한 군에서 그 활성도가 의미있게 감소하였으며, 이 실험에서 H_2O fraction을 함께 처리한 군은 유의성 있는 감소를 보이지 않았다.

이후에는 이미 apoptosis와 관련있다고 알려져 있는 Bax 및 Bcl-2와, 이외에도 apoptosis에 관여하리라 추정되는 gene으로 TβR-Ⅰ, TβR-Ⅱ, Smad2, Smad3, Smad4, p15/INK4B, p21/Waf1, PAI-1등을 이용하여 RT-PCR을 이용하여 결과를 이끌어냈다.

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)는 house keeping gene으로 어떠한 약물의 영향에 대해서도 그 발현이 대체로 변하지 않는 특성을 가지고 있어 기타 유전자의 발현을 실험하는데 기준이 되는 gene의 역할을 한다. Bax, Bcl-2는 간세포의 TGFβ1-induced apoptosis에 밀접한 관련을 갖는다. Bcl-2는 분자량 26kD의 protein으로서 chemoresistance에 중요한 역할을 담당하여 여러종류의 자극에 대해 apoptosis를 block하는 특이 기능을 가지고 있다고 알려져 있다. Bcl-2 Family중

Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1은 apoptosis를 억제하고, Bcl-Xs, Bax, Bak, Bad, Bid는 cell death를 증진시킨다. Bax는 Bcl-2와 서로 상대적인 protein으로 대부분의 경우 heterodimer의 형태로 존재한다고 알려졌다[25-27]. 이외에도 apoptosis에 관여하리라 추정되는 gene으로 TβR-Ⅰ, TβR-Ⅱ, Smad2, Smad3, Smad4, p15/INK4B, p21/Waf1, PAI-1등이 있으나 본실험에서 인진 분획물의 TGFβ1관련 apoptosis를 억제하는 효과에 관여하는 것은 그 중 p15/INK4B, p21/Waf1, PAI-1으로 확인되었다. 즉, 유전자 level에서 butanol fraction이 Bax gene 및 p15/INK4B, p21/Waf1, PAI-1을 억제하고, Bcl-2는 증가시켰다. 구체적으로 TGFβ1 signal을 세포내로 전달하는 TGFβ1 type I 및 type II receptor의 발현에는 변화를 야기하지 않으며 TGFβ1 signal의 cytoplasmic signal mediator인 Smad2, Smad3, 및 Smad4의 발현에도 아무런 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 butanol fraction은 TGFβ1의 signal transduction pathway를 구성하는 유전자들의 발현 자체에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. PAI-1, p15/INK4B, p21/Waf1 유전자의 발현이 인진의 butanol fraction으로 처리했을 때 TGFβ1 처리에도 불구하고 전혀 증가하지 않는다는 사실은 TGFβ1 signal의 세포핵내로의 전달이 약물에 의하여 차단되거나 또는 핵내로 전달된 signal에 의한 유전자조절을 억제하는 성분이 약물에 존재함을 암시하고 있다. 이는 인진의 butanol fraction이 간세포의 apoptosis를 gene regulation을 통해 억제하고 있다는 것을 말한다.

따라서 인진의 butanol과 H_2O fraction, 특히 butanol fraction은 간세포의 세포주기 및 TGFβ1-induced apoptosis에 관여하는 유전자의 조절을 통해 세포의 손상을 억제하는 간세포보호 효과가 있음을 인정할 수 있으며, 이는 각종 간질환에 인진 분획물을 사용할 수 있는 근거와 간세포보호효과를 가진 신약 개발 가능성을 제시한 것으로 사료된다.

결 론

인진의 각 분획물이 간세포의 TGFβ1-induced Apoptosis에 미치는 영향을 확인하고자 Tryphan blue exclusion assay, DNA fragmentation assay, Cpp32 protease activity assay를 시행하고, 각 유전자의 발현을 파악하기 위해 Quantitative RT-PCR을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Tryphan blue exclusion assay 결과, TGFβ1 처리군과의 비교에서 인진의 butanol fraction 투여군과 H_2O fraction 투여군은 뚜렷한 apoptosis 억제를 보였다. 특히 butanol fraction에서의 apoptosis 억제가 현저하였다.
2. DNA fragmentation assay 결과, 인진의 butanol 및 H_2O fraction이 유의성있게 apoptosis를 억제하였다. 억제효과는 농도의존적으로 나타났으며 특히 butanol fraction 에서 현저하였다.
3. Cpp32 protease activity assay결과, 인진의 butanol fraction이 Cpp32 protease의 activity를 저하시켰으며 H_2O fraction에서는 효과가 나타나지 않았다.
4. Quantitative RT-PCR 결과, 유전자 level에서 butanol fraction은 Bax gene, p15/INK4B, p21/Waf1 및 PAI-1을 억제하였고, Bcl-2를 증가시켰다. 그리고 TβR-Ⅰ, TβR-Ⅱ, Smad2, Smad3, Smad4에는 영향을 미치지 않았다.

이상의 실험결과에서 인진의 butanol fraction은 간세포의 TGFβ1-induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 세포 손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효능을 나타내었다. 향후 이러한 효과를 나타내는 물질에 대해 보다 상세한 연구조사 및 약제의 개발이 필요하리라 사료된다.

참고 문헌

1. 정영화. B형 만성간염에 대한 항바이러스 요법의 현재와 미래. 김원동. 내과학의 최신지견 1. 서울:한국의학. 1999: 77-80.
2. Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. Hepatology. 1994;19:1354-1359.
3. 김우호. 면역-기묘한 생체방어와 생명유지의 기구. 서울:대양출판사. 1993:82-89.
4. Masahiro Y, Kazuo O, Makoto M, Kazunori F Yasuhiro K. The Herbal Medicine Inchin-ko-to Inhibits Liver Cell Apoptosis Induced by Transforming Growth Factorβ1. Hepatology. 1996;23:552-559.
5. 이이노시로우. B형, C형 간염박사. 서울:태웅출판사. 1998:221-222.
6. 지형준. 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해. 서울:한국메디칼인덱스사. 1998:638.
7. 張仲景. 仲景全書. 서울:高文社. 1984:225, 408-411.
8. 張仲景. 金匱要略. 서울:杏林書院. 1984:392-394.
9. 통계청. 96년도 사망원인통계결과. 서울. 1997:20-40.
10. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. Genes and Development. 1996;10:1-15.
11. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267:1456-1462.
12. 김창민. 아포토시스와 간질환. 대한간학회지. 1996;2:96-103.

13. 김성진. Transforming Growth factorβs-연구의 역사와 미래. Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology News. 1996;3:17.
14. 박근칠. Transforming Growth factorβ와 악성종양. Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology News. 1996;3:21-24.
15. 유영도. Molecular Events Initiated by TGFβ signal. Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology News. 1996;3:18-20.
16. Franziska O, Wilfried B, Wolfram P, Paul B, Evs E, Michaela S, Rolf SH. Effect of Transforming Growth Factor β on Cell Death of Cultured Rat Hepatocytes. CANCER RESEARCH. 1991;51:2478-2485.
17. Malcolm W. Feedback from inhibitory SMADs. NATURE. 1997;389:549-551.
18. Joan M, Akiko H, Fang L. TGFβ signalling through the Smad pathway. trends in CELL BIOLOGY. 1997;7:187-192.
19. 이준성, 송동화, 박찬욱, 이문성, 조성원, 심찬섭, 진소영. 중합효소 연쇄반응법을 이용한 Helicobacter pylori의 검출. 대한내과학회지. 1995;49:347-359.
20. 안덕균. 원색한국본초도감. 서울:교학사. 1998:112.
21. 우홍정, 이장훈, 김영철. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol중독 및 CCl_4중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18:411-429.
22. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳淸肝湯加減方이 간세포활성, 세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19:337-372.
23. 강우성, 이장훈, 우홍정. 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999;20:91-105.
24. 표임정, 이장훈, 우홍정. 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1999;22:119-140.
25. Ikeda H, Hirato J, Akami M, Matsuyama S, Suzuki N, Takahashi A, Kuroiwa M. Bcl-2 Oncoprotein Expression and apoptosis in neuroblastoma. Journal of Pediatric surgery. 1995;30:805-808.
26. Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Sato M, Tanikow K. Nuclear DNA Fragmentation and Expression of Bcl-2 in Primary Biliary Cirrhosis. Hepatology. 1997;25:1077-1084.
27. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van-Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. Nature. 1997;385:637-640.