

茵陳蒿가 Fas-FasL 매개형 간세포 Apoptosis에 미치는 영향

김선강, 김형환, 안중환, 김종대, 김철호*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 한의과대학 생화학교실*

Effects of Artemisia Capillaris Fructus on Fas-FasL-induced Apoptosis in Hepatocyte

Seon-Kang Kim, Hyeong-hwan Kim, Joong-hwan An, Jong-Dae Kim, Cheorl-Ho Kim*

Dept. of Internal Medicine, College of oriental medicine, Dongguk University
Dept. of Biochemistry, College of oriental medicine, Dongguk University*

Objectives : Recently, it was known that the major cause of hepatitis is apoptosis reaction mediated by Fas-FasL. Since Artemisia Capillaris Fructus has long been applied to cure the jaundice in oriental medicine. Therefore, this study was carried out to examine the effect of fractions of Artemisia Capillaris Fructus on Fas-FasL-mediated apoptosis in hepatocytes.

Methods : This study employed propidium iodide negative cell count assay and some the other biochemical assays.

Results : This study confirms that hepatitis has been occurred by apoptosis mediated by Fas-FasL in cultured hepatocyte and fractions of Artemisia Capillaris Fructus restrain apoptosis induced Fas-FasL.

Conclusions : Water-extracted fraction, methanol extracts, ether-soluble fraction, and buthanol-soluble fractions of Artemisia Capillaris Fructus restrain Fas-FasL-mediated apoptosis in hepatocyte.

Silica gel chromatograph of Buthanol-soluble fraction of Artemisia Capillaris Fructus restrain Fas-FasL-mediated apoptosis in hepatocyte. Artemisia Capillaris Fructus could be applied to cure hepatitis.

Key Word : Artemisia Capillaris Fructus, apoptosis, Fas-FasL, hepatitis

I. 緒 論

Apoptosis는 다세포생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로 여러 가지 생물학적 변화와 형태학적 변화를 특징으로 하는 예정된 세포사멸에 해당된다. 이러한 세포사의 형태학적 변화는 주로 세포질막의 브레브(blebbing)현상, 핵응축(nuclear

condensation)현상, 염색체의 절편화(DNA fragmentation)를 수반하여 이루어진다.

세포사는 두가지형으로 세포안의 신호에 의해 유발되는 형과 외부신호에 의해 유발되는 형으로 구분되며 TNS와 Fas는 외부신호에 의해 유발되는 세포사로 종양괴사인자 수용체계 단백질인 Fas(또는 CD95, APO-1)가 그의 리간드(ligand)인 FasL과 결합함으로써 죽음의 신호를 세포안에 전달함으로써

전개된다.² 이러한 세포사는 Fas-FasL의 상호작용으로 면역계 항상성의 파괴, 자가면역 질환의 병리현상을 유발하는데 그 대표적인 것으로 간세포의 염증과 제1형 당뇨병을 들 수 있다.^{3,5}

최근, 생체안에서 간염에서 간세포 파괴의 주요원인은 Fas-FasL의 결합에 의한 간세포(hepatocyte)의 파괴에 의한다는 것이 급성간염과 만성간염에서 증명이 된바 있다.⁶

바이러스에 의한 세포손상은 직접적인 손상보다는 바이러스에 감염되었을 때 발생하는 인체면역응답의 결과가 주요기전인데⁷ 바이러스에 감염된 간세포

가 항원을 제시하면 T 세포와 nature killer 세포가 공격하거나 보체계의 활성화 등으로 인해 세포가 제거된다. 이러한 감염세포의 제거기전은 아직까지 명확하지 않으나 세포독성 T 세포를 중심으로 하는 apoptosis가 제시되고 있으며 바이러스로 인한 간세포손상에는 Fas 및 TGFβ1등을 매개로 하는 apoptosis가 주요 기전으로서 주목받고 있다.^{8,9)}

따라서, Fas-FasL매개 세포사를 억제하는 천연약물의 개발은 알콜성 및 환경성 간질환을 포함한 B형, C형 바이러스 감염에 의한 간염치료에 차세대 간질환 치료제로서 중요시되고 있으며, 이러한 새로운 간질환 치료제가 개발이 이루어 진다면 임상적으로 대단히 중요한 것이다.

이에 저자는 본 연구에서 간세포 세포사(apoptosis)에 있어서 간세포의 염증질환이 주로 Fas-FasL 상호작용에 있음을 확인하였으며, 인진호추출물이 Fas-FasL 상호작용을 억제하는 활성도 가지고 있음을 증명하는데 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 動物

Fas-FasL 상호작용에 의한 간세포 세포사를 확인하고 인진호 분획물의 간세포세포사 억제효과를 검증하기 위하여 실험동물로서 야생형 실험용 생쥐, caspase^{-/-}결손생쥐 및 caspase^{+/+}결손 생쥐를 사용하였으며, CD-1 생쥐는 caspase 저해제 실험에 사용하였다. Fas-L을 발현하는 NIH3T3 섬유아세포는 Hughes와 Crispe의 방법으로 배양하고¹⁰⁾ caspase 저해제는 Bachem사(USA)

제품인 zVAD.fmk를 사용하였다.

2) 藥材

동국대학교 한방병원에서 구입한 건조 인진호(*Artemisiae Capillaris Fructus*) 1 kg을 세절하여, 2500ml의 증류수와 함께 6시간 가열추출한 뒤, 가재를 이용하여 찌꺼기를 거른 뒤, 동결건조기를 이용하여 총 265g의 분말로 하였다.

2. 方法

1) 인진호로부터 분획 개발을 위한 열수 및 메탄올, 에테르 및 부탄올을 이용한 추출과 분획

메탄올(methanol ; MeOH)추출을 위하여, 메탄올(MeOH)로 8시간씩 8회 온침하고 추출액을 감압하에서 농출 건조하여 메탄올엑기스를 243g 얻었다. 이 추출물을 [scheme 1]에 나타난 듯이 분획하였다. 즉, 메탄올추출물에 열수 2리터를 더하여 현탁시키고 냉각한 후 1리터의 에테르(ether)로 5회, 다음에 1리

터의 부탄올(buthanol ; BuOH)로 3회 추출하여 에테르(ether) 가용분획 32g, 부탄올(BuOH) 가용분획 104g을 얻었다. 나머지는 반으로 감압 농출한 뒤 동결건조시켜 갈색분말 34g을 얻었다.

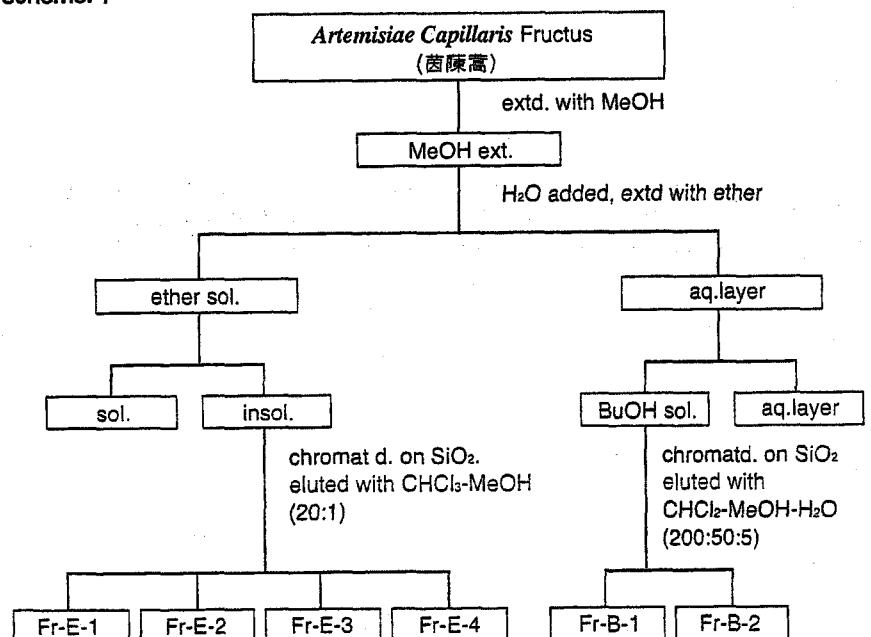
에테르 가용분획(32g)은 석유에테르(petroleum ether) 100ml로 3회 냉침시켜 가용분획(14g)과 불용분획(16g)으로 나누었다. 석유에테르불용분획중에서 10g을 실리카 젤 크로마토그래피로(500g, Silica gel 60, 70-250 mesh, Merck)로 전개하여 CHCl₃-MeOH (20:1)로 용출하여 5개의 분획(분획E-1: 4g; 분획E-2: 3g; 분획E-3: 1.3g; 분획E-4: 1.0g; 분획E-5: 0.8g)을 얻었다.

부탄올(BuOH)가용분획(104g)은 실리카 젤 크로마토그래피로(500g, Silica gel 60, 70-250 mesh, Merck)에서 CHCl₃-MeOH-H₂O(200:50:5)로 용출하여 2개의 분획(분획B-1: 52g; 분획B-2: 32g)을 얻었다.

2) 초대 생쥐 간세포의 배양

생쥐로부터 분리한 초대 간세포

scheme. 1



(primary hepatocyte)는 밀도가 cm^3 당 2×10^5 가 되도록 하룻밤 동안 배양하여 다음날 고밀도로 배양된 FasL을 발현하거나 FasL을 발현하지 않는 섬유아세포를 트립신처리후 Waymouth MB 배지로¹¹ 세포밀도가 cm^3 당 5×10^5 가 되도록 조정하여 간세포와 합쳐서 공동 배양한다.

3) 세포사의 유발검정

간세포의 생존성과 핵형태는 각 커버

슬립당 150내지 180세포수로 조정하여 각각 $3 \mu\text{M}$ 의 propidium iodide (PI)로 10분간 그리고 $2 \mu\text{M}$ 의 4',6'-diamidino-2-phenylindole 으로 10분간 염색하여 현미경으로 관찰한다. 이때 간세포는 세포질에 bleb을 형성하고 PI-positive인 사멸된 세포와 PI-negative인 생존세포, 그리고 정상적인 형태를 취한 상태로 PI-negative인 생존세포로 구분한다.

4) Apoptosis에 의한 세포사의 억제 효과활성 검정

인진호 각 분획물의 활성을 확인하기 위하여 $50 \text{ mg}/15\text{ml}$ 농도로 세포배양 웰에 첨가할 때 FasL발현-NIH3T3에 의한 세포사 억제효과 검정은 $3 \mu\text{M}$ 의 propidium iodide (PI)로 10분간 염색하여 현미경으로 관찰하여 간세포는 정상적인 형태를 유지하고 PI-negative인 생존세포로 구분하였다.

III. 實驗成績

1. Fas-FasL매개성 간세포 (hepatocyte) apoptosis에 의한 간염생성의 확인

인진호추출물의 Fas-FasL매개에 의한 간염에 대한 억제 및 치료효과활성을 확인하기 위하여 생쥐의 초대간세포 (primary hepatocyte)를 분리후 배양하였다 (cm^3 당 2×10^5). 또한 FasL을 발현하거나 발현하지 않는 NIH3T3 섬유아세포 (cm^3 당 5×10^5)를 합하여 공배양하였다. 이때, Fas-FasL세포사의 핵심효소인 caspase저해제인 zVAD.fmk를 대조군으로 caspase³와 caspase⁸는 대조 생쥐군으로 사용하였다.¹⁰

간세포의 생존성은 $3 \mu\text{M}$ 의 propidium iodide (PI)로 10분간 염색하여 현미경으로 관찰하였으며 간세포는 정상적인 형태를 취한 상태로 PI-negative인 생존세포로 구분하였다. 상기의 방법대로 간세포를 FasL을 발현하는 섬유아세포와 공배양하였을 때 생쥐의 간세포가 24시간내에 사멸하였으나 대조군의 섬유아세포와 같이 배양된 간세포는 대부분이 생존하였다 (Fig.1). 더우기 간세포를 FasL을 발현하는 섬유아세포와 동시에 배양하였을 때 일시적인

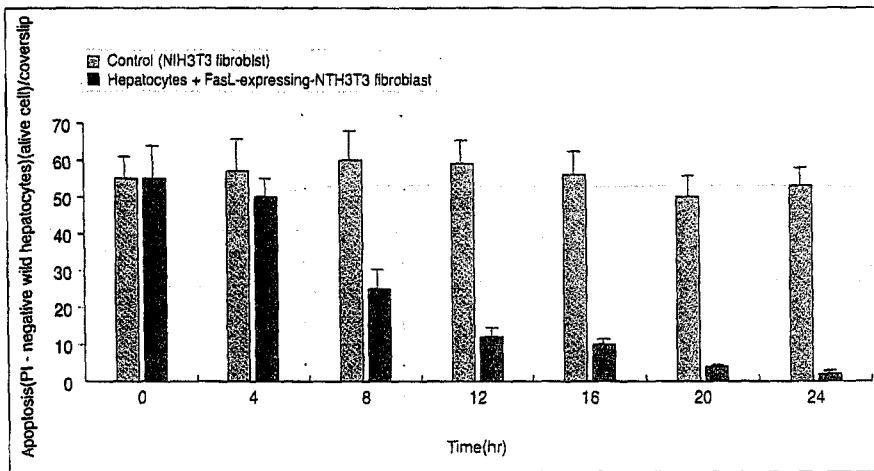


Fig. 1. Influences of culture time with FasL-expressing fibroblast on hepatocyte apoptosis(PI-negative cell)

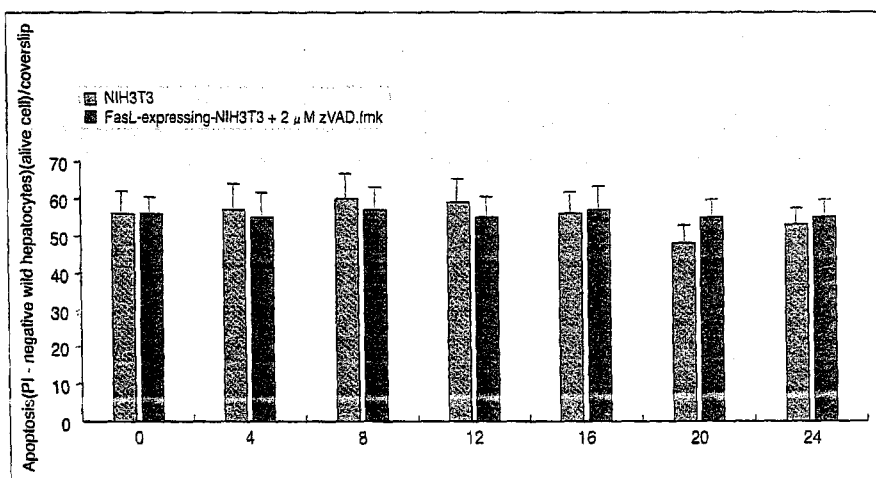


Fig. 2. Obstructions of Caspase-3 inhibitor on hepatocyte apoptosis caused by FasL-Fas receptor and The roles of culture time (PI-negative cell)

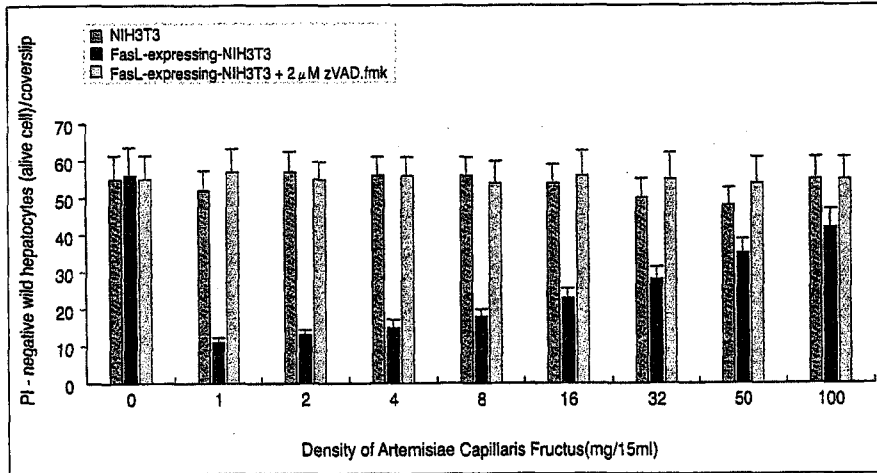


Fig. 3. Inhibitory effects of density of crude hot-water extracts obtained from *Artemisiae Capillaris Fructus* on hepatocyte apoptosis cultured with FasL-expressing fibroblast (PI-negative cell)

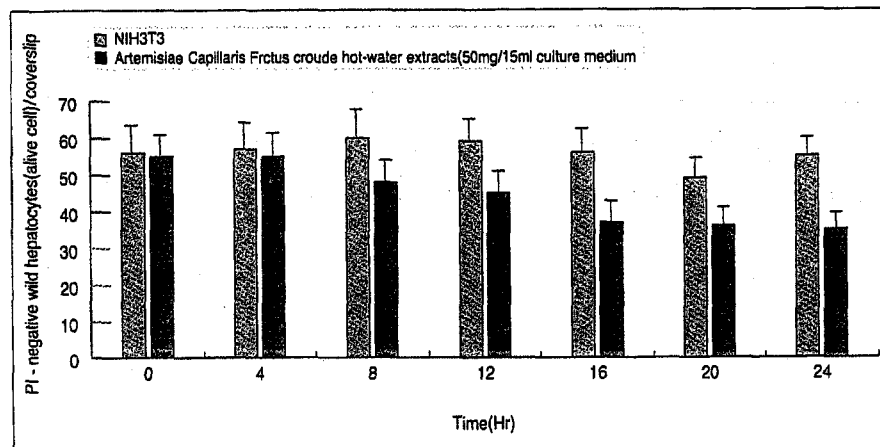


Fig. 4. Inhibitory effects of FasL-Fas receptor of crude hot-water extracts obtained from *Artemisiae Capillaris Fructus* on hepatocyte apoptosis and Inhibitory effects of culture time

bleb 형성이 시작되었으며 DNA절단이 확인되었다.

2. FasL-Fas receptor에 의한 간세포 Apoptosis의 Caspase-3 저해제에 의한 저해 및 시간에 따른 역할

Apoptosis에서 죽음의 신호를 전달 받은 단백질분해효소인 caspase-3은 세포내 단백질과 DNA분해효소를 수식을

통해 활성화시켜 apoptosis를 촉진시킨다. 본 연구에서는 Caspase-3 저해제인 zVAD.fmk를 간세포와 NIH3T3 fibroblast와 공동 배양세포에 첨가하였을 때 간세포의 apoptosis에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 간세포의 사멸이 완전히 억제되었으며, 세포질의 bleb 현상 그리고 핵절단 현상이 완전히 소멸되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 FasL이(섬유아세포가 생산하는 FasL) 간세포

포의 세포사를 유발함을 증명하는 것이며, zVAD.fmk에 의해서 저해되는 Caspase-3가 간세포의 세포사에 직접 관여하고 있음을 확인하였다.

3. 인진호 열수추출물의 최적 억제 활성을 주는 농도측정

예비실험으로서 인진호 열수 조추출물의 최적 억제활성을 주는 농도를 결정하기 위하여 각각의 농도별로 활성을 측정하였다. 즉, 0 mg/15ml 세포배양액, 1 mg/15ml, 2 mg/15ml, 4 mg/15ml, 8 mg/15ml, 16 mg/15 ml, 32 mg/15ml, 50 mg/15 ml 및 100 mg/15ml의 각각을 조제하여 억제활성을 검정한 결과 50 mg/15ml 과 100 mg/15 ml 농도에서 가장 강한 Apoptosis 억제활성을 나타내었다(Fig.3). 그러나 100 mg/15 ml 농도에서는 간세포의 증식에 영향을 미치는 영향 때문에 향후에서는 50 mg/15ml농도를 사용하기로 하였다.

4. 인진호 열수추출물의 FasL-Fas receptor 에 간세포 apoptosis의 억제효과와 시간에 따른 억제효과

인진추출물의 농도를 50 mg/15ml 농도로 첨가할 때 FasL발현-NIH3T3에 의한 세포사를 약 40%이상 감소시켜 간세포생존능력을 향상시켰으며 처리시간에 의존하여 apoptosis를 억제하였다(Fig.4). 이러한 결과는 섬유아세포가 생성하는 FasL에 의한 간세포의 Fas 수용체결합을 인진추출물이 방해 내지 저해함으로써 Fas수용체에 세포사의 신호가 전달되는 것이 차단되기 때문으로 보인다.

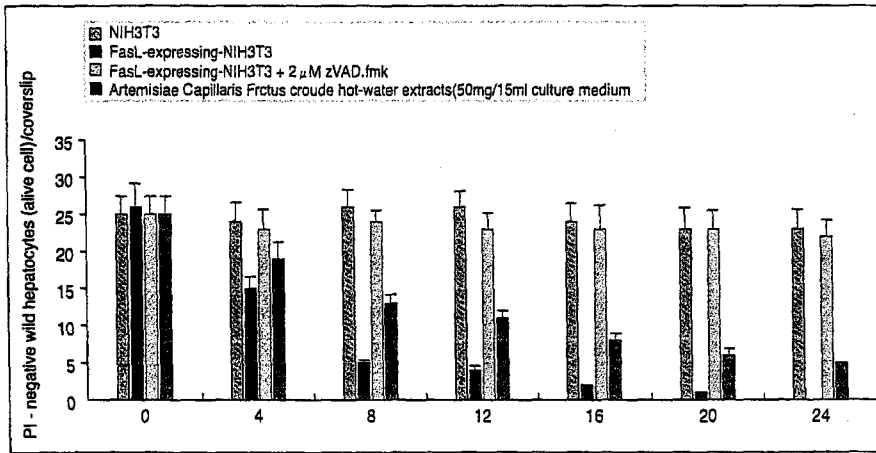


Fig. 5. Inhibitory effects of crude hot-water extracts obtained from Artemisiae Capillaris Fructus on hepatocyte apoptosis cultured with FasL-expressing fibroblast (PI-negative cell)

Table 1. Inhibitory effects of fractions obtained from Artemisiae Capillaris Fructus by Methanol, Ether, Buthanol, and Petroleum ether on hepatocyte apoptosis cultured with FasL-expressing fibroblast in 24 hours (PI-negative cell)

| Fraction | Dose (mg/15ml) | PI-negative wild hepatocyte (alive cell)/coverslip ^a |
|------------------------------------|----------------|---|
| H ₂ O fraction | 55 ± 5.4 | |
| Methanol extracts | 10 | 39 ± 4.3* |
| Ether-soluble fraction | 8 | 37 ± 4.1* |
| Buthanol-soluble fraction | 8 | 24 ± 3.2* |
| Petroleum ether-soluble fraction | 4 | 8 ± 0.6 |
| Petroleum ether-insoluble fraction | 4 | 43 ± 5.2* |

^a Each numerical value is result of 3 different experiment (± S.E).
 CCl₄ treatment control significant examination: * p<0.01, ** p<0.001

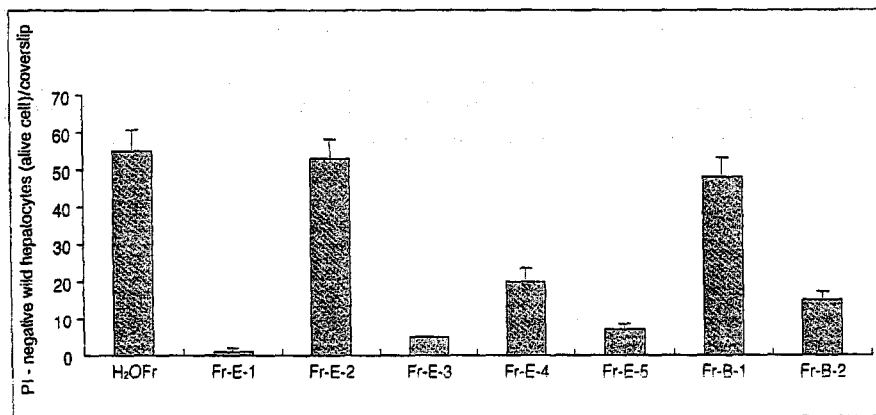


Fig. 6. Inhibitory effects of fractions obtained by Silica gel chromatography from Artemisiae Capillaris Fructus extracted by organic solvent on hepatocyte apoptosis cultured with FasL-expressing fibroblast in 24 hours (PI-negative cell)

5. 인진호 열수추출물의 caspase-3결손 생쥐 간세포 세포사 억제효과

인진호추출물의 보호효과는 야생형 간세포보다는 caspase-3이 결손된 생쥐에서 분리된 간세포에서 보다 효과적임이 확인되어 Fas-FasL에 의한 세포사는 주로 caspase-3를 매개하고 있음을 확인하였다(Fig.5).

6. Fas-FasL매개에 의한 간염에 대한 인진호 열수 추출물 및 각 분획을 이용한 억제효과

인진호의 열수 추출물 및 각종 유기용매에 의한 추출물들의 섬유아세포와 24시간 공배양시 간세포의 세포사에 대한 억제효과 (PI-negative 세포)를 검정한 결과, 메탄올 추출물 이외에 에테르 가용분획, 부탄올가용분획, 석유에테르 불용분획에서 강한 억제효과를 보였으며, 석유에테르가용분획에서는 활성이 존재하지 않음을 확인하였다(Table 1).

7. Fas-FasL매개에 의한 간염에 대한 인진호추출물의 실리카젤 크로마토그래피로 정제된 각 분획에 의한 억제효과

인진호추출물을 유기용매로 분획한 후 이들을 실리카젤 크로마토그래피로 정제분획한 시료에 대해 섬유아세포와 24시간 공배양시 간세포의 세포사에 대한 억제효과 (PI-negative 세포)를 검정한 결과, 분획-E-2, 분획-E-4, 및 분획-B-1에서 강한 억제효과를 보였으나, 분획-E-1, 분획-E-3, 분획-E-5 및 분획-B-2에는 활성이 존재하지 않음을 확인하였다 (Fig.6).

IV. 考 察

우리나라의 경우 간염 바이러스에 의한 만성간질환의 이환율이 세계적으로 높은 편이고 사회적으로 중요한 역할을 담당할 40대에서 간질환으로 인한 사망률이 가장 높게 나타나 사회적인 문제로 되고 있다. 이에 따라 많은 연구가 진행되고 있으며 특히 최근에는 간염치료에 대한 한약물의 연구가 주목되고 있다.¹²

간염은 식욕부진, 구역, 구토, 권태감, 상기도, 감염증상, 열감, 간의 동통과 비대, 황달등의 증상을 나타내는 질환으로 바이러스, 중독성, 알코올 등이 원인이 된다고 알려졌다.¹³

최근의 연구에서는 생체안에서 간염의 주요 원인이 Fas-FasL의 결합에 의한 간세포(hepatocyte)의 파괴에 의한다는 것이 급성간염과 만성간염에서 증명된 바 있다.⁶

간염바이러스에 의한 간염의 병리기전은 주로 바이러스성 단백질에 대한 숙주의 면역반응과 바이러스의 직접적인 세포독성에 기인 할 것으로 이해되고 있으며 이 과정에서 apoptosis가 관여한다는 증거들이 밝혀지고 있다. B형 및 C형 간염에서 acidophilic body, piecemeal necrosis 등의 조직소견이 apoptosis와 부합됨이 알려지고 있고 Fas 발현이 piecemeal necrosis가 있는 부위에서 강력하며 이 발현 정도와 간염의 정도가 상관 관계가 있음도 밝혀지고 있다.¹⁴

B형 간염 바이러스의 HBsAg을 이용하여 만든 Transgenic mice model에서 CTL반응을 촉진하였을 때 전격성 간염이 관찰되며 항 Fas 항체를 쥐의 복강내로 주사하면 간세포의 apoptosis를 통한 전격성 간괴사를 일으킴이 보고되고 있다.¹⁵

세포사(apoptosis)는 다세포생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로 여러 가지 생물학적 변화와 형태학적 변화를 특징으로 하는 예정된 세포사멸에 해당된다. 주로 세포질막의 브레브(blebbing)현상, 핵응축(nuclear condensation)현상, 염색체 DNA의 절편화(DNA fragmentation)를 수반하여 이루어지며 이러한 형태학적 특징은 가장 확실한 apoptosis의 증거로서 지금도 인정되고 있다.¹⁶ 세포사는 종양괴사인자 수용체계 단백질인 Fas (또는 CD95, APO-1)가 그의 리간드(ligand)인 FasL과 결합함으로써 죽음의 신호를 세포안에 전달함으로써 전개된다. 이러한 세포사는 Fas-FasL의 상호작용으로 면역계의 항상성의 파괴, 자가면역질환의 병리현상을 유발한다.^{3,5}

Fas는 TNF-receptor family에 속하는 유전자로 apoptosis를 일으킨다. 만약 간세포가 Fas-antibody에 의해 자극되면 apoptosis가 유발된다. Cytotoxic T lymphocyte(CTL)에 의해 면역반응이 일어날 때도 apoptosis는 중요한 역할을 한다.²

따라서, Fas매개 apoptosis를 억제하는 천연약물의 개발은 알콜성 및 환경성 간질환을 포함한 B, C형바이러스 감염치료에 차세대 치료제로서 중요시되고 있으며, 이러한 새로운 간질환 치료제가 개발이 이루어 진다면 임상적으로 대단히 중요한 것이다.

韓醫學에서 肝炎이라는 명칭을 사용한 바는 없지만 黃疸, 脇痛, 肝熱, 勞傷, 酒傷, 積聚, 鼓脹등 증이 여기에 속한다. [素問 刺熱篇]에서 “肝熱病者 小便先黃 腹痛 多臥 身熱”이라하여 肝熱病證이 肝炎의 증상과 일치함을 볼수

있다.¹⁷ 黃疸에 대하여는 [素問 平人氣象論]에 “尿黃赤安臥者黃疸” “目黃者曰黃疸”이라 하였고 [靈樞 論疾診尺論]에 “身痛而色微黃 齒垢黃 爪甲上黃 黃疸也”라하여 황달에 대해 자세히 기술하고 있다.

茵陳蒿는 菊花科에 속한 다년생 초목인 사철쑥의 줄을 건조한 것으로 異名으로 茵陳 馬先 綿茵陳 등 있다. 肝, 膽, 脾, 胃經에 入하여 清熱利濕 退黃疸하는 효능이 있어 황달형 간염에 치료 효과 있다.¹⁸ 또한 역대의서의 主治를 보면 [神農本草經]¹⁹에는 “主風濕寒熱邪氣 熱結黃疸” [本草綱目]²⁰ “治通身發黃 小便不利 除頭熱 去伏瘕” [本草從新]²¹ “瀉火 平肝 化痰 止咳 止汗 利濕消腫 疔瘡火諸毒”이라 하였다. 최근의 연구²²⁻²⁴에서는 利膽, 補肝, 消炎, 鎮痛, 利尿, 降壓作用등이 확인되었고 또한 解熱作用, 降血脂症, 降血壓作用, 充細菌作用, 抗腫瘤作用 등이 확인되어 간염치료와 고지혈증 관상동맥질환등의 치료에 응용되고 있다.

이 등의 연구에서 인진호 추출물이 CCl₄에 의한 간독성 억제에 효과가 있는 것으로 나타났으며²⁵ 또한 인진호가 간세포 활성을 높이고 세포주기 및 apoptosis에 관여하는 유전자 발현에 관계하여 세포손상을 억제하며 간기능을 보호하는 효능이 인정되고 있다.²⁶

인진호의 부탄을 분석은 간세포의 TGFβ1-induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 세포손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효능을 나타낸다.²⁷

본 연구에서는 이와같은 간염의 새로운 기전인 Fas-FasL 상호작용에 의한 세포사에 대한 인진호의 간염억제효과를 검증하기 위해서는 우선 초대생쥐 간세포의 배양과 세포사(Apoptosis)유발이 필요하므로 생쥐로부터 분리한

초대 간세포 (primary hepatocyte)와 고밀도로 배양된 FasL을 발현하거나 FasL을 발현하지 않는 섬유아세포를 트립신처리후 Waymouth MB 배지로 합쳐서 공동 배양하였다. 이때 간세포의 생존성과 핵형태는 각 커버슬립당 150내지 180세포수로 조정하여 각각 3 μ M의 propidium iodide (PI)로 10분간 그리고 2 μ M의 4',6'-diamidino-2-phenylindole 으로 10분간 염색하여 현미경으로 관찰한다. 이때 간세포는 세포질에 blebbing을 형성하고 PI-positive인 사멸된 세포와 PI-negative인 생존세포, 그리고 정상적인 형태를 취한 상태로 PI-negative인 생존세포로 구분한다. 상기의 방법대로 간세포를 FasL을 발현하는 섬유아세포와 동시에 배양하였을 때 모든 분리된 생쥐의 간세포가 24시간내에 사멸하지만 대조군의 섬유아세포와 같이 배양된 간세포는 대부분이 생존하였다. 또한 간세포를 FasL을 발현하는 섬유아세포와 동시에 배양하였을 때 일시적인 bleb 형성이 시작되었으며 DNA절단이 확인되었다. 그러나 일반적인 Caspase 저해제인 zVAD.fmk를 2 μ M농도로 첨가하였을 때 간세포의 사멸뿐 아니라 세포질의 bleb현상 그리고 핵절단현상이 완전히 소멸되었다. 이러한 결과는 FasL을 발현하는 섬유아세포가 공동배양된 간세포의 세포사를 유발함을 증명하는 것이며, zVAD.fmk에 의해서 저해되는 Caspase가 세포사의 핵심요소임을 밝혀지게 되었다. 이는 Fas-FasL 매개성 간세포의 apoptosis에 의한 간염의 생성을 확인한 것이다.

한편, Apoptosis에서 죽음의 신호를 전달받은 단백질분해효소인 caspase-3은 세포내 단백질과 DNA분해효소를 수식을 통해 활성화시켜 세포사를 촉진시킨다. 본 연구에서는 Caspase-3 저해

제인 zVAD.fmk를 간세포와 NIH3T3 fibroblast와 공동 배양세포에 첨가하였을 때 간세포의 세포사(apoptosis)에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 간세포의 사멸이 완전히 억제되었으며, 세포질의 bleb현상 그리고 핵절단현상이 완전히 소멸되었다. 이러한 결과는 FasL(섬유아세포가 생산하는 FasL)이 간세포의 세포사를 유발함을 증명하는 것이며, zVAD.fmk에 의해서 저해되는 Caspase-3가 간세포의 세포사에 직접 관여하고 있음을 밝히는 것으로 앞으로 작용기전에 대한 해석이 필요할 것으로 보인다.

또한 간세포의 Apoptosis에 의한 간염의 억제효과활성 검정을 위해 인진호 조추출물의 활성을 확인하기 위하여 50 mg/15ml 농도로 세포배양웰에 첨가할 때 FasL발현-NIH3T3에 의한 세포사를 약 40%이상 감소시켜 간세포 생존능력을 향상시켰다. 이러한 결과는 섬유아세포가 생성하는 FasL에 의한 간세포의 Fas 수용체결합을 인진호추출물이 방해 내지 저해함으로써 Fas수용체에 세포사의 신호가 전달되는 것이 차단되기 때문으로 보인다.

이러한 인진호추출물의 보호효과는 야생형 간세포보다는 caspase-3이 결손된 생쥐에서 분리된 간세포에서 보다 효과적임이 확인되어 Fas-FasL에 의한 세포사는 주로 caspase-3를 매개하고 있음을 확인하였다.

인진호 열수추출물의 최적 억제활성을 주는 농도를 결정하기 위하여 각각의 농도별로 활성을 측정된 결과 50 mg/15ml 과 100 mg/15 ml 농도에서 가장 강한 Apoptosis 억제활성을 나타내었다. 그러나 100 mg/15 ml 농도에서는 간세포의 증식에 영향을 미치는 영향 때문에 향후에서는 50 mg/15ml 농도를 사용하기로 하였다.

인진추출물의 농도를 50 mg/15ml 농도로 첨가할 때 FasL발현-NIH3T3에 의한 세포사를 약 40%이상 감소시켜 간세포생존능력을 향상시켰으며 처리시간에 의존하여 apoptosis를 억제하였다. 이러한 결과는 섬유아세포가 생성하는 FasL에 의한 간세포의 Fas 수용체결합을 인진호추출물이 방해 내지 저해함으로써 Fas수용체에 세포사의 신호가 전달되는 것이 차단되기 때문으로 보인다.

그리고 인진호로부터 간질환억제 활성을 갖는 분획 개발을 위한 열수 및 메탄올, 에테르 및 부탄올을 이용한 추출을 하여 메탄올엑기스를 243g, 에테르(ether) 가용분획 32g, 부탄올(BuOH) 가용분획 104g을 얻었다. 나머지는 수층은 반으로 감압 농축한 뒤 동결 건조시켜 갈색분말 34g을 얻었다.

에테르 가용분획 (32 g)은 석유에트르 (petroleum ether)로 가용분획(14 g)과 불용분획 (16 g)으로 나누고 석유에테르불용분획중에서 10g을 실리카젤 크로마토그래피로 (500g, Silica gel 60, 70-250 mesh, Merck)로 전개하여 CHCl₃-MeOH (20:1)로 용출하여 5개의 분획(분획E-1: 4g; 분획E-2: 3g; 분획E-3: 1.3g; 분획E-4: 1.0g; 분획E-5: 0.8g)을 얻었다.

부탄올(BuOH)가용분획 (104g)은 실리카 젤 크로마토그래피로 (500g, Silica gel 60, 70-250 mesh, Merck)에서 CHCl₃-MeOH-H₂O (200:50:5)로 용출하여 2개의 분획(분획B-1: 52g; 분획B-2: 32g)을 얻었다

위에서 얻은 인진호의 열수 추출물 및 각종 유기용매에 의한 추출물들의 섬유아세포와 24시간 공배양시 간세포의 세포사에 대한 억제효과 (PI-negative 세포)를 검정한 결과, 메탄올 추출물 이외에 에테르가용분획, 부탄올

가용분획, 석유에테르불용분획에서 강한 억제효과를 보였으며, 석유에테르가용분획에서는 활성이 존재하지 않음을 확인하였고 인진호추출물을 유기용매로 분획한 후 이들을 실리카 젤 크로마토그래피로 정제분획한 시료에 대해서 간세포의 세포사에 대한 억제효과 (PI-negative 세포)를 검정한 결과, 분획-E-2, 분획-E-4, 및 분획-B-1에서 강한 억제효과를 보였으나, 분획-E-1, 분획-E-3, 분획-E-5 및 분획-B-2에는 활성이 존재하지 않음을 확인하였다

본 연구에서는 간세포 apoptosis에 있어서 간세포의 염색질환이 주로 Fas-FasL 상호작용에 있음을 확인하였으며, CCl₄ 처리로 유발되는 간실질 장애에 보호효과가 확인된 인진호추출물이 Fas-FasL 상호작용을 억제하는 활성도 가지고 있음을 증명하였다. 따라서 본 연구에서는 인진호추출물은 간대사계 효소들의 보호효과 이외에, 새로운 기전인 Fas-FasL 상호작용을 억제하는 효과를 가지고 있음을 제시하고 새로운 간질환 치료제로서의 용도를 확인하였으며, 인진호추출물에 함유된 Fas-FasL의 결합저해와 FasL의 발현 억제제를 함유하는 간질환 치료제로서 용도를 연구한 새로운 기전을 해명하게 되었다.

V. 結 論

茵陳蒿추출물이 Fas-FasL 상호작용에 의한 apoptosis 억제에 미치는 영향을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인진호 열수추출물, 메탄추출물, 에테르가용분획 추출물, 부탄올가용분획 추출물은 Fas-FasL 상호작용을 매개로 한 간세포 apoptosis를 억제하였다.

2. 인진호 부탄올가용분획 추출물 중 실리카젤 크로마토그래피로 분획된 것은 Fas-FasL 상호 작용을 매개로 한 간세포의 apoptosis를 억제하였다.

3. 인진호 추출물은 Fas-FasL 상호 작용을 매개로 한 apoptosis로 인한 간기능장애, 급성 간염, 만성 간염등의 질환에서 간기능 보호활성을 갖는 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Cohen J J. Apoptosis. Immunol Today 1993;14:126-130
2. Nagata S, Goldstein P. The Death factor. Science 1995;267:1449-1456
3. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, Matis LA. The role of Fas in autoimmune diabetes. Cell 1997; 89(1):17-24.
4. Thomas S. Griffith, Thomas Brunner, Sharon M. Fletcher, Douglas R. Green, thomas A. Ferguson Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege. Science 1995;170:1189-1192
5. Donald Bellgrau, Danial Gold, Helena Selawry, Jodene Moore, Alex Franzusoff Richard C. Duke. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. Nature 1995;377:630-632
6. Feldmann G. Liver apoptosis J Hepatol 1997;26(2):1-11
7. Hiramatsu N, Hayashi N, katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y et Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. hepatology 1994;19:1354-1359
8. 김우호. 번역-기표한 생체방어와 생명유지의 기구. 서울: 대양출판사; 1993,82-89
9. Masahiro Y, Kazuo O, Makoto M, Kazunori F, Yasuhiro K. The Herbal Medicine Inchin-ko-to Inhibits Liver Cell Apoptosis induced by Transforming Growth Factor β 1. Hepatology. 1996;23:552-559
10. Hughes, D. P. and Crispe, I. N. J. Exp. Med 1995;182:1395-1401

11. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell. 1998;94(3):325-37
12. Hong jung woo, Jang hoon Lee, Young chul Kim et : A Study on the theraeotic effect of orient medicine on hepatitis B The Kyung Hee Medicine 1997 vol.13 no.3
13. 의과대학교수편. 오늘의 진단과 치료. 서울: 도서출판 한우리; 1999; 713-725
14. Hiramatsu N, Hayashi n, Katayama K et al. Immunohistochemical detection of fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. Hepatology 1994;19:1354-1359
15. Ando K, Moriyama T, Guidotti LG et al. : Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mice model of fulminant hepatitis. J Exp Med 1993;178:1541-1554
16. 김창민. 아포토시스와 간질환. 대한간학회지 1996;2:96-103
17. 전국한의과대학 간계내과학교수. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원출판부; 1989;230
18. 강병수 고운채 김선희 등. 본초학. 서울: 영림사; 1991;328-329
19. 馬繼興. 神農本草經集註. 北京: 人民衛生出版社; 1995;110-111
20. 李時珍. 本草綱目. 北京: 中醫古籍出版社; 1994;410-411
21. 吳儀絡. 本草從新. 北京: 紅期出版社; 1996;74
22. 鄭虎占. 中藥現代研究與應用. 北京: 學院出版社; 1998;3092-3110
23. 雷載權. 中華臨床中藥學. 北京: 人民衛生出版社; 1998;885-887
24. 陳發奎. 常用中藥藥有效成分含量測定. 北京: 人民衛生出版社; 1997;458-461
25. 이채중 김형환 김종대 김철호. 인진호의 열수 및 메탄을 에테르 부탄올 추출물이 CCl₄ 유발에 의한 간독성 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2000;21(1): 100-107
26. 강우성 이장우 우홍경. 인진과 인진사령 산가감방이 간세포활성 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지 1999;20(1): 91-105
27. 이지현 이장훈 우홍중. 인진분획들이 TGF β 1-induced apoptosis에 미치는 영향 대한한의학회지 2000;21(1):53-61