

## 茵陳butanol분획의 TLC추출성분이 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향

박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정  
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

### Effect of *Injin* Butanol Fraction with Thin Layer Chromatography on Fas-mediated Apoptosis

Yong-Jin Park, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

**Objective :** The aim of this study is to investigate the effect of *Injin* butanol fractions with Thin Layer Chromatography on Fas-mediated Apoptosis.

**Method :** *Injin*-butanol fraction separated by TLC. MTT assay, cell cycle analysis, Caspase-3 protease assay, DNA fragmentation assay and quantitative RT-PCR were performed to evaluate the effects of TLC extraction of *Injin*-butanol fraction on cell viability, cell cycle progression and apoptosis.

**Results :** Scopoletin, luteolin, apigenin and unknown powder was isolated by TLC. Fas-mediated apoptosis analysis shows that scopoletin has inhibiting function on apoptosis. Caspase-3 protease assay analysis shows that scopoletin inhibits activity of caspase-3. Quantitative RT-PCR analysis shows that no activity on caspase-3, but apoptosis inhibition cytokine -Bcl-2- is activated, and apoptosis activating cytokine -Bax- is unactivated.

**Conclusion :** These results show that each fraction of *Injin*-butanol TLC extraction, especially scopoletin, acts as a protective function on liver cell viability, and inhibitory function on apoptosis. (*J Korean Oriental Med 2002,23(2):57-69*)

**Key Words:** *Injin*-butanol fraction, Thin Layer Chromatography(TLC), HepG2, scopoletin, Fas-mediated apoptosis, RT-PCR

## 서론

우리 나라는 간염바이러스에 의한 만성 간질환의 이환율이 매우 높고 왕성한 사회적 활동층인 40대

남자의 경우 간암에 의한 사망률 또한 세계적으로 매우 높은 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 이와 같은 간질환을 효과적으로 치료하고 관리하기 위해 항바이러스제, 면역조절제, 간기능보조약물 등이 상용화되어 있으나 간장질환의 진행을 막는 만족스러운 치료방법은 현재 제시되지 못하고 있는 실정이다.

한의학에서 간질환에 대한 내용은 문헌상 주로 黃疸, 脹滿, 積聚 등에서 살펴볼 수 있는데, 특히 바이러

· 접수 : 2001년 11월 20일 · 채택 : 2002년 3월 22일  
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 간계내과학교실  
(Tel. 02-958-9118, FAX: 02-958-9120, E-mail: hjwoo@khmc.or.kr)

스성 간질환과 관련된 증후들은 주로 黃疸門에 자세히 기술되어 있고 대표적인 치료처방은 茵陳五苓散 등이 다양하게 적용되어 왔다<sup>23)</sup>. 禹<sup>5)</sup>는 茵陳五苓散과 茵陳 증량한 구성방이 흰쥐 손상간에 미치는 영향을 보고하였고, 李<sup>6)</sup>는 茵陳四苓散 등 茵陳을 主材로 한 몇 종류의 처방이 실험적으로 간손상에 대해 간 보호작용과 이담작용 및 지질 강하작용등의 효능이 있음을 보고하였다. 또한 金<sup>7)</sup>이 茵陳清肝湯의 안전성에 관한 연구에서 급성·아급성·만성 경구독성 및 어떠한 부작용도 나타내지 않았다고 보고 하였다.

최근에 와서는 한약에 대한 면역학적·유전학적 접근이 시도되고 있는데, 그 연구방향은 유전자의 발현에 따른 변화를 측정하는 것이다<sup>8)</sup>. 그중 Apoptosis는 1972년 Ken<sup>9)</sup>등이 정립한 개념으로 간세포의 증식과 재생, 간암의 병리과정 및 바이러스성 간 손상에 있어서 Fas를 매개로 하는 apoptosis의 영향이 있음<sup>10)</sup>이 밝혀졌다. 이에 따라 茵陳을 이용한 Fas 매개의 유전자 관련연구가 많이 진행되어 왔는데, 그 연구로서 朴<sup>11)</sup>은 茵陳清肝湯가미방이 간세포보호작용 및 Bcl-2, Bcl-XL의 활성을 높여 세포사망을 억제하는 효과를 보고하였고, 洪<sup>12)</sup>은 茵陳清肝湯가미방이 etoposide에 손상된 간세포 보호효과 및 Cpp32, Fas의 발현을 억제하고 Bcl-2를 활성화시켜 apoptosis를 억제하는 효과가 있음을 보고하였다. 또, 姜<sup>13)</sup>은 茵陳과 茵陳四苓散가미방이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향을, 表<sup>14)</sup>는 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 연구하였고, 유의성있는 결과를 얻은 바 있다. 주목할 만한 것은 최근의 연구 중에 茵陳의 구성물질 중에서 어떤 분획의 물질이 특정한 효과를 낼 수 있는지를 감별해 내기 위한 시도가 있었는데, 李<sup>15)</sup>는 茵陳분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향에서 butanol fraction이 간세포활성을 높이고 간

기능을 보호함을 증명하였고, 또 李<sup>16)</sup>는 茵陳분획물이 인체간세포의 TGFβ1-induced apoptosis에 미치는 영향에서 butanol fraction이 간세포활성을 높이고 간기능을 보호함을 증명하였고, 高<sup>17)</sup>는 茵陳四苓散 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향에서 역시 butanol fraction에서 간세포 보호작용이 뚜렷함을 증명하였다.

이에 저자는 간세포의 보호작용이 있을 것으로 추정되는 茵陳butanol분획을 TLC(thin layer chromatography)의 방법으로 세분화된 추출물을 얻어내고 이를 Fas를 매개로한 apoptosis에 미치는 영향을 분자생물학적 방법으로 검증하고자 HepG2 cell을 이용하여 간세포 활성도를 MTT assay로 측정하였고 cell cycle analysis를 통해 세포주기를 관찰하였다. 또한 Fas-antibody로 유발된 HepG2 cell의 apoptosis 억제정도를 알아보기 위하여 flow cytometry를 이용한 apoptotic analysis와 caspase-3 protease의 활성을 측정하고 Fas 유전자발현의 변화를 파악하기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하여, 유의성있는 결과를 얻었는바 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 한약규격집<sup>18)</sup>에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

#### 2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료 665 g을 3차 증류수 4.8 l 로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압

Pharmacognosy Name, Scientific Name and Dose of Injin

Drug	Pharmacognosy Name	Scientific Name	Dose
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	<i>Artemisia capillaris THUNB.</i>	665g

농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 70.6 g의 건조추출물을 얻어 10.53%의 수율을 보였다.

## 2. 방법

### 1) 유기용매를 이용한茵陳성분의 추출

위에서 얻은茵陳 중 30 g을 이용하여, 1차 추출용매인 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, H<sub>2</sub>O의 5가지 용매에 녹였다. 그 방법은 우선 sample 30 g을 증류수 300 ml에 녹인다. 그 후 hexane 200 ml를 넣어, 섞고 분리한다. 상층액을 모아 hexane을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 hexane fraction을 얻는다. 물층에 chloroform 200 ml를 넣고 분리한다. 하층을 모아 chloroform을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 chloroform fraction을 얻는다. 다시 물층에 ethylacetate 200 ml를 넣어 분리한다. 상층액을 모아 ethylacetate를 날린다. 남은 부분을 모아 동결건조하여 ethylacetate fraction을 얻는다. 다시 물층에 butanol fraction 200 ml를 넣어 분리한다. 상층액을 모아 butanol을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 butanol fraction을 얻는다.

Five Kinds of 1st Solvents

1st Solvents	Yield(g)
Hexane	0.12
Chloroform	3.24
Ethylacetate	1.79
Butanol	1.56
H <sub>2</sub> O	18.45

Four Kinds of 2nd Solvents and Stock Solution(100 mg/1 ml)

1st Solvents	2nd Solvents	Concentration of Stock solution
Hexane 동결건조 추출성분	→ DMSO	→ 100 mg/1 ml
Chloroform 동결건조 추출성분	→ Chloroform	→ 100 mg/1 ml
Ethylacetate 동결건조 추출성분	→ DMSO	→ 100 mg/1 ml
Butanol 동결건조 추출성분	→ Butanol	→ 100 mg/1 ml
H <sub>2</sub> O 동결건조 추출성분	→ H <sub>2</sub> O	→ 100 mg/1 ml

위에서 얻은 각각의 약물을 2차 추출용매인 DMSO, chloroform, butanol, H<sub>2</sub>O를 이용하여 다시 녹여서 100 mg/ml의 농도로 stock solution을 제작하였다.

### 2) Thin Layer Chromatography를 이용한 butanol 추출물의 분획

Butanol 추출물 10g을 내경 5 cm의 silica gel column chromatography에서 전개용매 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(7:3:1, 하층)로 전개하여 50 ml씩 100개를 분취하였다. 각각의 분획들을 TLC에서 UV (254 nm) 및 50%황산으로 분무한 후 hot-plate에서 가열하여 반점들을 확인하였다. 이 중 11-12번 분획, 14-16번 분획, 18-20번 분획 및 42번-51번 분획들이 단일물질들 함유하고 있음을 확인하여 이들을 각각 rotary evaporator로 농축하여 Fr. 1-4로 라벨하였다. Fr. 1-3을 MeOH로 재결정하여 결정성 화합물 1, 2, 3을 분리하였다. Fr. 4를 MeOH로 재결정하였을 때 무정형의 흑갈색 화합물 4를 분리하였다. 실험에 사용한 시약은 일급 시약을 사용하였으며 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Merck, Art 7734)를 사용하였다. 용점은 Electrothermal digital melting point apparatus를 사용하였으며 보정하지 않았다. UV spectrum은 Tegimenta Uvicon 990 UV spectrophotometer, IR spectrum은 Bomem MB-100 FT-IR을 사용하여 각각 측정하였다. Mass spectrum은 JMS D-300(Jeol)을 이용하여 측정하였다. <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker-AM 300 spectrometer를 사용하여 내부표준물질로서 TMS를 사용하여 측

정하였다.

### 3) 세포배양 및 약물처리

#### (1) 세포배양

인체의 간암세포주인 HepG2를 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하여 DMEM 배지 90%와 fetal bovine serum 10% 혼합배지에서 배양하였다. 세포들은 5%의 CO<sub>2</sub> 상태가 유지되는 37 incubator에서 배양하였다.

#### (2) 간세포에 대한 약물처리

동결건조된 약제 100 mg을 1 ml의 용매 (H<sub>2</sub>O 또는 DMSO)에 녹여, 멸균된 약물을 1.0 g/ml, 10 g/ml, 50 g/ml, 100 g/ml의 농도로 투여하고 각각 6시간, 12시간, 24시간, 48시간이 경과한 후 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 protein, DNA, RNA를 추출하였다.

## 실 험

### 1. MTT 반응실험

#### 1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5 mg/ml을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22 µm의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그후 1×10<sup>6</sup>개의 세포를 포함하고 있는 100 µl의 cell suspension에 10 µl의 MTT stock solution을 첨가하였다.

#### 2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 보존한 후 100 µl의 0.04 M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals을 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570 nm에서 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader로 OD(optical density)를 측정하였다.

### 2. Cell cycle analysis

Cells pellete(5×10<sup>6</sup>)를 0.2 ml PBS에 현탁시킨 후 2 ml의 ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정

시킨다. PBS에 강력하게 재현탁시킨 후 100 µg/ml RNase와 40 µg/ml propidium iodide(PI)가 포함된 PBS에서 37℃로 30분간 배양한 후 세포를 회수하여 FACScan( FACS Caliber cellquest program(Becton Dickinson))을 이용하여 DNA의 양을 정량한다.

### 3. Apoptosis analysis 및 flow cytometry

약물을 처리하여 각 시기별로 세포를 회수한 후 PBS로 2회 세척한다. 2 ml 의 75% cold ethanol/25% PBS를 넣어 세포를 1시간 동안 4℃에서 고정한다. PBS로 다시 2회 세척한 후 100 µg/ml RNase와 40 µg/ml propidium iodide(PI)가 포함된 PBS에서 37℃로 30분간 배양한다. 세포를 회수하여 FACScan( FACS Caliber cellquest program(Becton Dickinson))을 이용하여 sub G1 fraction을 정량한다.

### 4. Caspase-3 assay

100 µl의 lysis buffer(0.5% NP-40, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl and 50 mM Tris, pH 7.5)에 세포(7×10<sup>6</sup> cells)를 용해시킨 후 15000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한다. 20 µl의 cell lysate를 180 µl의 reaction buffer(100 mM, pH 7.5 HEPES, 20% Glycerol, 5 mM DTT, 5 mM EDTA and 100 M Peptide substrate)에서 37℃에 방치한다. 405 nm에서 ELISA reader를 이용하여 OD값의 변화곡선을 얻는다.

### 5. Quantitative RT- PCR

#### 1) RNA추출

##### (1) GSS solution 제작

250 g의 guanidine isothiocyanate를 293 ml의 3차 증류수에 넣은 후 여기에 다시 0.75 M sodium citrate 17.6 ml와 10% sarkosyl 26.4 ml를 넣어 65℃에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다.

##### (2) Solution D 제작

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1 M의 농도로 넣어 제작하였다.

(3) 1×10<sup>7</sup>개의 세포에 solution D 500 µl, 2 M sodium acetate 50µl (pH 4.0)를 넣어 잘 혼합한 후

water-saturated phenol 500  $\mu$ l, chloroform : isoamyl alcohol(24:1) 100  $\mu$ l를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

(4) 혼합용액을 15000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000  $\mu$ l를 넣어 -70 $^{\circ}$ C에서 24시간 침전시켰다.

(5) 15000 rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA pellete를 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30  $\mu$ l의 RNase - free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

2) cDNA 제작

(1) 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

Reverse transcriptase buffer 2  $\mu$ l, Random hexamer(10 pM) 1  $\mu$ l, AMV-RT(10 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, dNTP(10 pM) 1  $\mu$ l, RNase inhibitor 0.5  $\mu$ l, RNA 1  $\mu$ l

(2) 혼합용액이 20  $\mu$ l가 되도록 sterile water를 첨가한 후 42 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하였다.

(3) 각 시료에 80  $\mu$ l의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

3) Primer 제작

(1) House keeping gene

GAPDH : Glyceraldehyde - 3- Phosphate - dehydrogenase

Oligonucleotide primers used for a quantitative RT-PCR analysis

(All sequences are listed 5' to 3')

(2) Apoptosis- related gene

Oligonucleotide primers used for a quantitative RT-PCR analysis(All sequences are listed 5' to 3')

4) Quantitative RT- PCR

(1) 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10x amplification buffer 10  $\mu$ l , Mixture of dNTP(10 pM) 5  $\mu$ l,  
GAPDH primer 1(10 pM) 2  $\mu$ l, GAPDH primer 2(10 pM) 2  $\mu$ l,  
Template cDNA 4  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 77  $\mu$ l

(2) GAPDH primer를 이용하여 다음의 조건으로 36 cycles PCR반응을 시행하였다.

First cycle

Denaturation 5 min at 94 $^{\circ}$ C  
Annealing 1 min at 59 $^{\circ}$ C  
Polymerization 1 min at 72 $^{\circ}$ C

Subsequent cycle(34 cycle)

Denaturation 1 min at 94 $^{\circ}$ C  
Annealing 1 min at 59 $^{\circ}$ C  
Polymerization 1 min at 72 $^{\circ}$ C

Last cycle

Denaturation 1 min at 94 $^{\circ}$ C  
Annealing 1 min at 59 $^{\circ}$ C  
Polymerization 10 min at 72 $^{\circ}$ C

(3) PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 정량화 하였다.

Gene	Primer	Sequences	Orientation
GAPDH	2	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT	sense
	3	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
Fas	1	GATGCTTTAAGCGCATGGCG	sense
	M2	GTTTAAACACGGCTCCAATCGG	antisense
Caspase-3	1	CTGGTTTTCGGTGGGTGTGC	sense
	2	AGCAGCATCGACAGCTGTACC	antisense
Bcl-2	PM12	CTTTGAGTTTCGGTGGGGTCATGTG	sense
	PM14	TGACTTCACTTGTGGCCAGATAG	antisense
Bax	B3	GTGGCAGCTGACATGTTTTC	sense
	B4	AGCTGGGGCTCAGCCCATC	antisense

(4) 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 20%내로 정량화 하였다.

(5) 위의 결과를 바탕으로 target 유전자에 의한 PCR반응을 시행하여 상대적인 정량화를 시행하였다. Target gene의 PCR조건은 다음과 같다.

### 결 과

#### 1. TLC(thin layer chromatography)를 이용한茵陳butanol 추출물의 분획

茵陳butanol 추출물에 대한 TLC 분석을 실시한 결과 아래와 같은 대표적인 네가지 화합물 (화합물 1-4) 이 확인되었으며 분석결과는 아래 정리한 바와 같다..

##### 화합물 1: scopoletin<sup>19)</sup>

Colorless needles, mp 204-205

UV max (MeOH) nm (log): 229 (4.11), 254 (3.68), 261 (3.63, sh), 299 (3.68), 346 (4.07) IR (KBr, cm-1): 3340 (OH), 1705 ((-unsaturated ketone), 1610, 1572, 1510 (C=C) 1H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.26 (1H, d, J=9.5 Hz, H-3), 6.84 (1H, s, H-8), 6.92 (1H, s, H-5), 7.59 (1H, d, J=9.5 Hz, H-4)

13C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 166.3 (C-2), 113.4 (C-3), 107.5 (C-5), 143.3 (C-6), 149.2 (C-7), 103.5 (C-8), 149.2 (C-9), 113.4 (C-10)

MS (70eV) m/z (%): 192 (M+, 100), 177 ([M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 68), 164 ([M-CO]<sup>+</sup>, 35), 149 [M-CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup>

##### 화합물 2 : apigenin<sup>20)</sup>

Yellow powder, mp 345-350, Mg-HCl test: positive

UV max (MeOH) nm: 240 (sh), 268, 347

IR (KBr, cm-1): 3286 (OH), 1655 (-unsaturated ketone), 1608, 1503 (C=C) 1H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 6.18 (1H, J=2.1 Hz, H-6), 6.46 (1H, d, J=2.2 Hz, H-8), 6.74 (1H, s, H-3), 6.91 (2H, d, J=8.8 Hz, H-3", 5"), 7.89 (2H, d, J=8.9 Hz, H-2", 6")

13C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 164.2 (C-2), 102.9 (C-3), 181.8 (C-4), 161.5 (C-5), 98.9 (C-6), 163.8 (C-7), 94.0 (C-8), 157.4 (C-9), 103.7 (C-10), 121.2 (C-1"), 128.5 (C-2"), 116.0 (C-3"), 161.0 (C-4"), 116.0 (C-5"), 128.5 (C-6")

##### 화합물 3 : luteolin<sup>21,22)</sup>

Yellowish powder, mp 330, Mg-HCl, Zn-HCl test: positive, UV max (MeOH) nm (log): 253 (4.29), 267 (4.01), 349 (4.38)

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3400-3200, 1660 (-unsaturated ketone), 1605, 1498 (aromaic C=C) 1H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.95 (1H, s, 5-OH), 7.50 (1H, dd, J=1.7 Hz, H-2"), 6.90 (1H, d, J=8.5 Hz, H-5"), 6.67 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, J=1.7 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J=1.7 Hz, H-6)

13C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 164.1 (C-2), 103.1 (C-3), 181.8 (H-4), 161.7 (C-5), 99.0 (C-6), 164.3 (c-7), 94.0 (C-8), 157.4 (C-9), 104.0 (C-10), 121.7 (C-1"), 113.5 (C-2"), 145.9 (C-3"), 149.9 (C-4"), 116.2 (C-5"), 119.2 (C-6")

##### 화합물 4: unknown polyphenol 화합물.

용해도가 매우 낮아 DMSO로 녹여야함.

#### Target Genes

Cycle	Denaturation	Annealing	Polymerization
First	5 min at 94	1 min at 59	1 min at 72 °C
Subsequent	1 min at 94	1 min at 59	1 min at 72 °C
Last	1 min at 94	1 min at 59	10 min at 72 °C

2.茵陳butanol 추출물의 TLC 분획물이 인체 간세포의 세포활성에 미치는 영향

茵陳butanol 추출물의 TLC 분획물이 세포독성을 나타내는 지 여부를 확인하기 위하여, 각 분획물을 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 HepG2 세포에 처리한 후, MTT assay를 시행하였다. ELISA를 이용한 측정결과는 Table 1에 작성하였다. 정상대조군(normal control)과 처리군을 비교관찰한 결과 0.1-50  $\mu\text{g/ml}$  농도군에서는 각 약물의 세포독성이 관찰되지 않은 반면 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 apigenin 및 luteolin 처리군에서는 뚜렷한 세포활성의 저하가 관찰되었다. 이에 반해 scopoletin 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리군에서는 세포활성의 증가가 확인되었다 (Table 1).

3.茵陳butanol 추출물의 TLC 분획물이 인체 간세포의 세포분열에 미치는 영향

인진butanol추출물의 TLC 분획물이 인체 간세포의 세포분열에 미치는 영향을 분석하기 위하여 분획물이 처리되지 않은 대조군과 50  $\mu\text{g/ml}$  농도의 각 TLC 분획물이 48시간 처리된 HepG2 세포의 세포분열주기 양상을 flow cytometry을 이용하여 분석하였다. G1기, S기, G2/M기에 대한 분석 결과 정상대조군과 비교하여 apigenin 및 luteolin의 처리는 HepG2 세포의 분열을 G1기에서 억제하는 효과가 관찰된 반면

scopoletin 및 unknown 화합물의 처리군에서는 뚜렷한 세포주기의 변화가 관찰되지 않았다(Table 2). 본 실험에서 적용한 처리농도 50  $\mu\text{g/ml}$ 는 MTT 실험결과 세포독성이 관찰되지 않은 농도를 기준으로 정하였다 따라서 apigenin 및 luteolin은 간세포의 세포분열을 억제하는 효과를 지니는 반면 scopoletin 과 unknown 화합물은 세포주기에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며 MTT assay에서 관찰된 scopoletin의 세포활성증가효과는 세포분열증가 효과에 기인하지 않는 것으로 판단된다.

4.茵陳butanol 추출물의 TLC 분획물이 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향

Fas-mediated apoptosis에 대한 각 TLC 분획물의 영향을 분석하기 위하여 Fas antibody를 200  $\text{ng/ml}$ 의 농도로 12시간 처리한 후, 각 TLC 분획물을 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 36시간 처리한 후 FACSscan을 시행하였다. 결과는 sub-G1 phase의 apoptotic body가 Fas-antibody만 처리한 군에서는 56.3%로 증가하였는데 반해 scopoletin을 처리한 군은 42.5%(1  $\mu\text{g/ml}$ ), 33.7%(10  $\mu\text{g/ml}$ ), 21.2%(50  $\mu\text{g/ml}$ )로 각각 감소함이 발견되었다(Table 3). Apigenin, luteolin, unknown 화합물 처리군에서는 특이할만한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서茵陳butanol 분획물

**Table 1.** Effect of Four TLC Fractions of *Injin* on the Viability of HepG2 Cells Determined by MTT Assay (Optical Density)

		6h	12h	24h	48h
control		0.714	0.722	0.715	0.719
scopoletin	1 $\mu\text{g/ml}$	0.709	0.723	0.722	0.711
scopoletin	10 $\mu\text{g/ml}$	0.718	0.721	0.725	0.739
scopoletin	50 $\mu\text{g/ml}$	0.728	0.734	0.739	0.745
scopoletin	100 $\mu\text{g/ml}$	0.739	0.751	0.769	0.781
apigenin	1 $\mu\text{g/ml}$	0.709	0.719	0.712	0.710
apigenin	10 $\mu\text{g/ml}$	0.712	0.715	0.710	0.709
apigenin	50 $\mu\text{g/ml}$	0.700	0.704	0.702	0.701
apigenin	100 $\mu\text{g/ml}$	0.681	0.677	0.655	0.602
luteolin	1 $\mu\text{g/ml}$	0.720	0.717	0.716	0.718
luteolin	10 $\mu\text{g/ml}$	0.715	0.712	0.708	0.709
luteolin	50 $\mu\text{g/ml}$	0.701	0.708	0.703	0.702
luteolin	100 $\mu\text{g/ml}$	0.682	0.680	0.662	0.621
unknown	1 $\mu\text{g/ml}$	0.723	0.725	0.719	0.725
unknown	10 $\mu\text{g/ml}$	0.721	0.718	0.720	0.716
unknown	50 $\mu\text{g/ml}$	0.716	0.720	0.713	0.721
unknown	100 $\mu\text{g/ml}$	0.719	0.715	0.711	0.719

구성성분중 scopoletin이 가장 현저하게 Fas-mediated apoptosis를 억제하는 화합물임이 확인되었다.

5. Caspase-3 protease assay

Scopoletin의 Fas-mediated apoptosis 억제효과를 검증하기 위하여 apoptosis signal을 전달하는 세포내 주요단백인 caspase-3 protease 활성도를 ELISA를 이용하여 측정하였다. 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 Fas-antibody를 24시간 투여한 후, scopoletin 1-50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하고 30분, 60분후에 caspase-3 활성도를 측정하였다. Table 4에 정리한 바와 같이 scopoletin 처리농도에 비례하는 caspase-3 활성도의 저하가 관찰되었다.

6. Quantitative RT-PCR analysis

Fas-mediated apoptosis에 대한 scopoletin의 억제효과가 Fas-mediated apoptosis 신호전달계를 구성하는

유전자들에 대한 조절기능에 기인하는지를 분석하기 위해 quantitative RT-PCR을 실시하였다. Scopoletin은 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24 시간 및 48시간 처리되었으며 Fas, Bcl-2, Bax, Caspase-3 유전자의 mRNA 발현양상을 조사하였다. Table 5와 Fig. 1에 나타난 바와 같이 scopoletin은 Caspase-3의 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 apoptosis 억제자인 Bcl-2 유전자의 발현을 증가시키고 apoptosis 촉진 유전자인 Bax의 발현을 감소시키는 기능이 있음이 확인되었다. 이와 함께 Bcl-2 또는 Bax의 발현변화와 비교하여 상대적으로

Table 2. Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry

	G1	S	G2/M
Untreated control	66.5	17.4	16.1
scopoletin	67.2	16.9	15.9
apigenin	76.9	10.3	12.8
luteolin	79.2	7.6	13.2
unknown	67.3	17.1	15.6

Table 3. Flow Cytometric Analysis of Apoptosis

	Apoptotic sub G1(%)
Untreated Control	9.7
Fas Ab treated	56.3
+ scopoletin	
1 $\mu\text{g/ml}$	42.5
10 $\mu\text{g/ml}$	33.7
50 $\mu\text{g/ml}$	21.2
+ apigenin	
1 $\mu\text{g/ml}$	55.8
10 $\mu\text{g/ml}$	52.9
50 $\mu\text{g/ml}$	56.9
+ luteolin	
1 $\mu\text{g/ml}$	57.2
10 $\mu\text{g/ml}$	52.5
50 $\mu\text{g/ml}$	56.0
+ unknown	
1 $\mu\text{g/ml}$	57.2
10 $\mu\text{g/ml}$	52.5
50 $\mu\text{g/ml}$	56.0

Table 4. Effect of Scopoletin on Caspase-3 Protease Activity

	Optical Density	
	Exp.1	Exp.2
Untreated Control	0.011	0.023
Fas Ab treated	0.799	0.853
+scopoletin		
1 $\mu\text{g/ml}$	0.652	0.722
10 $\mu\text{g/ml}$	0.523	0.601
50 $\mu\text{g/ml}$	0.338	0.398

Table 5. Quantitative RT-PCR of Apoptosis-regulating Genes

	Expression levels(target/GAPDH)		
	Untreated Control	scopoletin(50 $\mu\text{g/ml}$ )	
		24h	48h
Fas	1.00	0.92	0.88
Bcl-2	1.00	1.45	1.82
Bax	1.00	0.73	0.55
Caspase-3	1.00	1.04	1.02

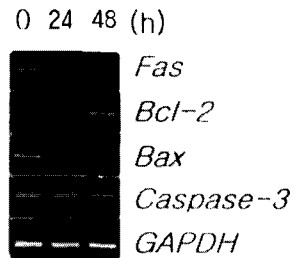


Fig. 1. Quantitative RT-PCR analysis of apoptosis-related genes in scopoletin-treated HepG2 cells.



로 그 정도가 약하지만 Fas 유전자의 발현감소가 확인되었다.

## 고 찰

간질환치료를 위한 한의학적인 연구는 오래전부터 지속되어 왔으며, 현대의학의 간질환 범주에 속하는 내용은 黃疸, 脹滿, 積聚, 脇痛, 勞倦傷, 酒傷 등에서 찾아볼 수 있는데, 특히 黃疸는 바이러스성 간염, 알콜성 간염, 간경변증 등간질환에 임상적으로 중요한 의미를 가진다<sup>23)</sup>. 이러한 황달의 원인으로 濕熱, 寒濕, 瘀熱 등이 원인으로 알려져 있으나 그 중 濕熱이 가장 주된 원인으로 인식되어 있어서 濕熱을 제거하는 清熱利濕이 한의학에서 간질환을 치료하는 중요한 개념<sup>4)</sup>으로 자리잡고 있다.

간질환을 포함하여 인체 내 정상적인 생리기능손상에 대한 최근의 연구경향은 점차 면역학적인 개념으로 관찰되고 있는데, 방법론적으로는 세포단위의 대사 및 apoptosis에 관여하는 단백질, DNA, RNA의 활성에 따라 발병원인과 변화과정을 물질대사의 상관관계로 판정할 수 있다는 가설<sup>8)</sup>에서 출발하고 있다.

크로마토그래피(Chromatography)는 1931년 R.J.쿤이 카로티노이드 색소의 분리에 사용하여 성공한 이후 급속히 발달하였는데, 흡착 크로마토그래피 또는 흡착분석이라 하여 널리 이용하게 되었다. 본 실험에 사용된 박층액체크로마토그래피(TLC, Thin Layer Chromatography)는 유리판 위에 흡착제의 얇은 층(250 μm 전후)을 만들어 이것을 고정상(固定相)으로 하고, 유기용매를 전개유동상(展開流動相)으로 한 크로마토그래피인데, 이 방법은 종이 크로마토그래피에 비해 전개 시간이 짧고(30~60분), 분리능률이 양호하며, 강한 산·강한 염기나 강렬한 시약 등을 발색시약(發色試藥)으로 사용할 수 있는 특징을 지니고 있다. 유기화합물의 분리·정제·정량·순도 검정, 반응이나 대사과정의 추적, 무기이온분석 등 응용범위가 넓은 장점이 있다.

위에 상술된 박층크로마토그래피에 의한茵陳butanol분획의 TLC추출결과 다음과 같이 네가지 화

합물(scopoletin, apigenin, luteolin, unknown powder)이 검출되었다.

첫째로 scopoletin인데, 더위지기에서 추출된 바 있는데, 더위지기는 韓國茵陳蒿(*Artemisia iwayomogi Kitamura*)라 하며 일명 白蒿, 玄蒿, 假茵陳, 茵陳蒿 등으로 불리는 국화과(Compositae)의 낙엽 아관목으로서 清熱, 清肝, 利膽, 利尿 등의 목적으로 사용되어 왔다. 더위지기의 항암에 관한 연구로는 정유 성분의 S-180 Ascites에 대한 항암활성과 scopoletin이 발암물질 DMBA(7,12-dimethylbenz(a)anthracene)에 의해 유도된 유방암을 억제함이 보고되어 있고, 특히 scopoletin이 강한 항발암활성을 나타내어, 더위지기의 항발암활성분의 하나일 것으로 사료되며 또한 항발암작용기전의 하나인 항산화작용을 나타내는 것으로 볼때 scopoletin의 항산화작용이 항발암작용에 기여할 것으로 추측 가능하다<sup>19)</sup>.

두 번째로 apigenin인데, 세 번째로 추출된 luteolin과 함께 고들빼기 잎으로부터 동정되었음이 보고되었는데, 플라보노이드인 luteolin, luteolin 7-O-glucoside 및 apigenin 7-O-glucuronide이 분리되었고, 가장 함량이 많은 유리 아미노산들은 glutamic acid, aspartic acid, serine, proline, valine 그리고 arginine으로 알려졌다. Luteolin과 apigenin은 흔히 같이 추출어진다<sup>20,22)</sup>. 물봉선의 음건한 전초를 95% MeOH로 추출한 후, ether와 EtOAc층으로 분획하여, ether fraction으로부터 3종의 flavone glycoside를 분리한 결과 4가지 화합물이 검출되었는데, compound 1은 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone인 luteolin으로, compound 2는 5,7,4'-trihydroxyflavone인 apigenin으로, compound 3은 5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone인 chrysoeriol로, compound 4는 5,4'-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-베타-델타-glucopyranoside인 chrysoeriol 7-glucoside로 동정되었다. 또한 luteolin은 *Codonopsis lanceolata*(S, et Z.) (Campanulaceae) 생약명 사삼(沙蔘)에서 추출되었음이 보고되어있다<sup>22)</sup>. 네 번째로 현재까지 동정(Identification)되어 보고되지 않은 화합물(unknown powder)이 검출되었는데, polyphenol계 화합물로 추정된다.

본 실험에 사용된 茵陳은 茵陳五苓散의 主藥이며, 현재도 임상에서 만성간질환의 치료에 清熱利濕을 목표로 널리 사용되고 있다. 茵陳은 국화과의 여러해살이풀 사철쭉 *Artemisia capillaris THUNB.*의 어린싹이며, 性味는 苦微寒하고 清熱, 利濕, 退黃하여, 급성간염, 만성간염, 간경변증, 간암 등에 널리 사용되고 있고, 담낭염, 담낭결석 등의 질환에도 사용되고 있다<sup>25)</sup>. 약리적으로 capillene, capillone, capilline, folic acid, dimethyl-aesculetin, caffeic acid,  $\beta$ -pinine 등의 성분을 함유하고 있다. 수침액에는 강한 해열작용이 있지만 煎汁으로 하면 작용이 약해지게 되고, 담즙분비를 촉진하여 이담작용을 가지고 있으며, in vitro상에서 황색포도구균, 고초균, 티푸스균 등을 억제하는데, 煎汁에서는 人形結核菌을 완전히 억제하는 작용이 있다. 또 ethylalcohol추출물은 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<sup>26)</sup>.

근래에 茵陳을 주된 약물로 구성하는 약물로서 간기능 개선효과를 관찰한 실험논문이 계속 보고되어 왔다. 주목할 만한 것은 최근의 연구 중에 茵陳의 구성물질에서 어떠한 특정 분획의 물질이 특정한 효과를 내는지를 감별해내는 시도가 있었는데, 李<sup>14)</sup>는 茵陳분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향에서 butanol fraction이 간세포활성을 높이고 간기능을 보호함을 증명하였고, 또 李<sup>14)</sup>는 茵陳분획물이 인체간세포의 TGF $\beta$ 1-induced apoptosis에 미치는 영향에서 butanol fraction이 간세포의 유전자를 조절함으로써 간기능을 보호함을 증명하였고, 高<sup>16)</sup>는 茵陳四苓散 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향에서 역시 butanol fraction에서 간세포 보호작용이 뚜렷함을 증명하였다.

이와 같은 일련의 연구 결과로 저자는 간세포의 보호작용이 있는 것으로 추정되는 茵陳butanol분획을 TLC(Thin Layer Chromatography)의 방법으로 세

분화된 추출물을 얻어내고 이를 Fas를 매개로한 apoptosis에 미치는 영향을 분자생물학적으로 검증하고자 HepG2 cell을 이용하여 간세포 활성도를 MTT assay로 측정하였고, cell cycle analysis를 통해 세포주기를 관찰하였다. 또한 Fas-antibody로 유발된 HepG2 cell의 apoptosis억제정도를 알아보기 위하여 DNA fragmentation assay를 시행하였으며, Fas 유전자 발현의 변화를 파악하기 위하여 quantitative RT-PCR을 시행하였다.

본 실험에서 사용한 MTT 검사방법은 cell의 viability를 측정하는 방법으로 1983년 Mosmann에 의해 처음 시도되었으며<sup>25)</sup>, 1986년 Cole과 1988년 Alley등에 의해 사용되기 시작하여 최근 널리 보급되었다<sup>26)</sup>. MTT는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue이며, 100mg, 250mg, 500mg 등 다양한 용량의 yellow water soluble tetrazolium 염색으로 세포의 viability에 따라 MTT-formazan의 양이 달라지며 이를 적절한 용매에 작용시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 세포의 생존능력을 측정한다. 약물에 의한 세포분열의 영향은 MTT assay의 결과로 추정할 수 있는 세포활성증가의 효과가 과연 세포주기의 조절에 의한 것인지를 알려주는 열쇠가 될 수 있다.

茵陳butanol추출물의 TLC분획물에 대한 세포독성을 확인하기 위하여, 각 분획물을 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 HepG2 세포에 처리한 후, MTT assay를 시행하였다. ELISA를 이용한 측정하였는데, 정상대조군(Normal control)과 처리군을 비교관찰한 결과 0.1~50  $\mu\text{g/ml}$  농도군에서는 각 약물의 세포독성이 관찰되지 않는 반면 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 apigenin 및 luteolin처리군에서는 뚜렷한 세포활성의 저하가 관찰되었다. 이에 반해 scopoletin 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리군에서는 세포활성의 증가가 확인되었다.

茵陳butanol추출물의 TLC분획물이 간세포의 세포분열에 미치는 영향을 분석하기 위하여 분획물이 처리되지 않은 대조군과 50  $\mu\text{g/ml}$ 농도의 각 TLC분획물이 48시간 처리된 HepG2 세포의 세포분열주기 양상을 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. G1기, S

기, G2/M기에 대한 분석결과 정상대조군과 비교하여 apigenin 및 luteolin의 처리는 HepG2 세포의 분열을 G1기에서 억제하는 효과가 관찰된 반면 scopoletin 및 unknown 화합물의 처리군에서는 뚜렷한 세포주기의 변화가 관찰되지 않았다. 본 실험에서 적용한 처리농도 50  $\mu\text{g/ml}$ 는 MTT 실험결과 세포독성이 관찰되지 않은 농도를 기준으로 정하였다. 따라서 apigenin 및 luteolin은 간세포의 세포분열을 억제하는 효과를 지니는 반면 scopoletin과 unknown 화합물은 세포주기에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며 MTT assay에서 관찰된 scopoletin의 세포활성 증가효과는 세포분열증가 효과에 기인하지 않는 것으로 판단된다.

茵陳butanol추출물의 TLC 분획물이 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Fas antibody를 200  $\text{ng/ml}$ 의 농도로 12시간 처리 한 후, 각 TLC 분획물을 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 36시간 처리한 후 FACScan을 시행하였다. 결과는 sub-G1 phase의 apoptotic body가 Fas-antibody만 처리한 군에서는 56.3%로 증가하였는데 반해 scopoletin을 처리한 군은 42.5% (1  $\mu\text{g/ml}$ ), 33.7% (10  $\mu\text{g/ml}$ ), 21.2% (50  $\mu\text{g/ml}$ )로 각각 감소함이 발견되었다. Apigenin, luteolin, unknown화합물 처리군에서는 특이할만한 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 茵陳butanol 분획물 구성성분중 scopoletin이 가장 현저하게 Fas-mediated apoptosis를 억제하는 화합물임이 확인되었다.

Scopoletin의 Fas-mediated apoptosis억제효과를 검증하기 위하여 apoptosis signal을 전달하는 세포내 주요단백인 caspase-3 protease활성도를 ELISA를 이용하여 측정하였다. 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 Fas-antibody를 24시간 투여한 수, scopoletin 1~50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하고 30분, 60분후에 caspase-3활성도를 측정하였다. 결과적으로 scopoletin처리농도에 비례하는 caspase-3 활성도의 저하가 관찰되었다.

Fas-mediated apoptosis에 대한 scopoletin의 억제효과가 Fas-mediated apoptosis 신호전달체계를 구성하는 유전자들에 대한 조절기능에 기인하는지를 분석

하기 위해 quantitative RT-PCR을 실시하였다. Scopoletin은 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 및 48시간 처리되었으며 Fas, Bcl-2, Bax, Caspase-3 유전자의 mRNA 발현양상을 조사하였다. 그 결과로 scopoletin은 Caspase-3의 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 apoptosis 억제자인 Bcl-2 유전자의 발현을 증가시키고 apoptosis 촉진 유전자인 Bax의 발현을 감소시키는 기능이 있음이 확인되었다. 이와함께 Bcl-2 또는 Bax의 발현변화와 비교하여 상대적으로 그 정도가 약하지만 Fas 유전자의 발현감소가 확인되었다.

총괄적으로 정리하면, 茵陳butanol분획의 TLC추출 결과로 scopoletin, apigenin, luteolin 및 unknown powder를 검출하였고 그 중 scopoletin은 간세포의 활성을 높이고, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

## 결론

茵陳butanol분획의 TLC추출성분이 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 살펴보기 위해 유기용매를 이용하여 butanol분획물을 얻은 후, TLC(thin layer chromatography)로서 scopoletin, luteolin, apigenin, unknown powder 등, 4가지 추출물을 분리하여, 각각의 성분을 MTT assay로 간세포의 활성도를 측정하고, flow cytometry를 이용하여 세포분열에 미치는 영향을 측정하였으며, Fas antibody를 이용하여 Fas-mediated apoptosis의 영향을 확인한 결과 추출물 중에서 scopoletin이 가장 우수한 성적을 보였다. 이에 따른 scopoletin의 Fas-mediated apoptosis 억제효과를 검증하기 위한 세포내 주요단백 측정을 위하여 caspase-3 protease활성도를 측정하고, scopoletin의 apoptosis 억제효과가 apoptotic 신호전달체계를 구성하는 유전자들에 대해 어떠한 작용을 하는지 규명하기 위해 Fas, Bcl-2, Bax, Caspase-3의 mRNA 발현 양상을 RT-PCR로서 분석하였다. 이에 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay의 결과에서 1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  농도군에서는 각 약물의 세포독성이 관찰되지 않았으나 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 apigenin 및 luteolin 처리군에서는 뚜렷한 세포활성의 저하가 관찰되었다. 그러나 scopoletin 100  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서는 세포활성의 증가가 확인되었다.

2. Flow cytometry를 이용한 Cell cycle analysis의 결과 scopoletin과 unknown분획물은 세포주기에 영향이 없었고, apigenin과 luteolin은 세포분열억제 효과가 있었다.

=3. Fas-mediated apoptosis에 대한 각각의 TLC분획의 영향분석의 결과 scopoletin이 가장 현저하게 apoptosis를 억제하는 추출물임이 확인되었다.

4. Scopoletin의 apoptosis억제효과 검증을 위한 caspase-3 protease활성도 측정결과 scopoletin이 caspase-3의 활성을 억제함이 확인되었다.

5. Scopoletin의 apoptosis억제효과 검증을 위한 Fas, Bcl-2, Bax, Caspase-3의 mRNA양상측정의 결과 apoptosis억제자인 Bcl-2의 발현을 증가시키고, apoptosis촉진유전자인 Bax의 발현을 감소시켜 apoptosis의 억제작용이 유전자의 조절을 통한 것임을 확인하였다.

이상의 실험결과에서茵陳butanol분획의 TLC추출 결과로 scopoletin, apigenin, luteolin 및 unknown powder를 검출하였고 그 중 scopoletin은 간세포의 활성을 높이고, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효과가 있음을 확인하였다. 이는茵陳butanol분획내에서 특정성분이 간세포활성에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 이번 연구를 통해 유효성분의 정체를 밝힘으로서 앞으로의 임상응용과 신약 개발에 활발히 이용될 수 있는 근거를 제시한 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 통계청. 1999년도 사망원인통계결과. 서울. 2000:20-40.
2. 張仲景. 仲景全書. 서울:高文社. 1984:225,408-411.

3. 張仲景. 金匱要略. 서울:杏林書院. 1984:392-394.
4. 전국한의과대학 간계내과학교실. 서울:동양의학연구회. 간계내과학. 2001:89-90.
5. 우홍정.茵陳五苓散과茵陳增量한構成方이 흰쥐 손상간에 미치는 영향. 서울:경희대학교대학원. 1998.
6. 이장훈. 간질환치료제의 효능에 관한 실험적 연구. 第2回韓·中學術大會 參加論文集 -肝臟編. 大韓韓醫師協會. 1995:123-165.
7. 김영철.茵陳清肝湯의 안전성에 관한 연구. 서울:경희대학교 대학원. 1996.
8. 김창민. 아포토시스와 간질환. The Korean Journal of Hepatology. 1996;2(2):96-103.
9. Kerr JF, Willie AH, Currie AR. Apoptosis. a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br. J. cancer. 1972;26:239-257.
10. Hiramatsu N., Hayashi N., Katayama K., Mochizuki K, Kawanishi Y., Kasahara A., Fusamoto H., and Kamada T.. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. J. Hepatology. 1994;19(6):1354-1359.
11. 박용진. The effect of Inchinchunggantang-derivative on Proliferation of Hepatocyte. The Graduate School of Kyung-hee University. Seoul. Korea. 1998.
12. 홍상훈.茵陳清肝湯加減方이 간세포활성, 세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 서울:경희대학교 대학원. 1998.
13. 강우성.茵陳과茵陳四苓散加減方이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향. 2000.
14. 표임정.茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 서울:경희대학교 대학원. 1999.
15. 이종훈.茵陳분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 서울:경희대학교 대학원. 1999.
16. 이지현.茵陳분획물이 인체간세포의 TGF $\beta$ 1-induced apoptosis에 미치는 영향. 서울:경희대학교 대학원. 2000.

17. 고 흥.茵陳四苓散 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 서울:경희대학교 대학원. 2000.
18. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울:한국메디칼인텍스사. 1998:638.
19. Bae JM, Rho YJ, Young HS, Choi JS, Park HJ, Park JC. Studies on the constituents of *Artemisia iwayomogi*. Pusan Bull. Pharm. Sci. 1992;26:88-93.
20. Kim JW, Choi KS. Studies on the constituents of *Impatiens textori*. Kor. J. Pharmacogn. 1993;24:26-31.
21. Young HS, Im KS, Choi JS. The pharmaco-chemical study on the plant of *Ixeris* spp. 2. Flavonoids and free amino acid composition of *Ixeris sonchifolia*. J. Korean Soc. Food Nutr. 1992;21:196-301.
22. Whang WK, Park KY, Chung SH, Oh IS, Kim IH. Flavonoids from *Codonopsis lanceolata* leaves. Kor. J. Pharmagn. 1994;25:204-208.
23. 안덕균. 원색 한국본초도감. 서울:(주) 교학사. 1998:112.
24. 김정룡 편저. 소화기계 질환. 서울:일조각. 2000:570-577.
25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunologic methods. 1983;65(1-2):55-63.
26. Cole S. P.. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. Cancer chemother Pharmacology. 1986;17(3):259-263.
27. 우홍정, 이장훈, 김영철. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol중독 및 CCl<sub>4</sub>중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):411-429.