

The Effects of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Extract on Pancreatic Fibrosis in the Rat

Nan Hee Choi¹, Jong Bong Kim², Jin Teak Kim¹ and In-Sick Park^{1*}

¹Department of Anatomy, College of Oriental medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

²Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

Received March 6, 2012 / Revised June 14, 2012 / Accepted June 17, 2012

Yacon has been used in folk medicines as a medicinal tea for hypoglycemia treatment. In a recent study described herein, antioxidative, antibacterial, antifungal activities, and cell-protective functions of yacon leaves have been reported. To evaluate the effects on fibrosis on pancreatitis, the efficacy of 1% of yacon extract (YE) on dibutyltin dichloride (DBTC) (8 mg/kg)-induced pancreatitis in rats was examined. On the 21st day after the DBTC treatment, a large increase in collagen was observed in the pancreas in the DBTC-treatment group (DT). But this was noticeably decreased with YE. In relation to the expression of COX-2, there was no response or a very weak response in the pancreas of the control group (CON). However, in DT, strong expression of COX-2 was observed in the pancreas on the 14th day, and COX-2 was present in inflammatory cells in the pancreas of the DT, especially on the 21st day. The expression was decreased for YE compared with DT. A remarkable increase in TGF- β 1 expression was observed in inflammatory cells in the pancreas in DT on the 21st day, whereas the expression was not found in YE after 21 days. However, on the 21th day, TGF- β 1 expression was increased in acinar cells of YE compared with DT. VEGF expression was very similar to the expression of in the pancreas. These results suggest that YE has an inhibitory effect on DBTC-induced pancreatic fibrosis.

Key words : Yacon, *Smallanthus sonchifolius*, pancreatic fibrosis, dibutyltin dichloride (DBTC)

서 론

췌장염(pancreatitis)은 췌장(pancreas)의 염증성 질환으로 임상 경과에 따라 크게 급성과 만성으로 분류하는데 급성은 췌장 기능이 대부분 정상으로 회복되나 만성은 췌장 손상이 영구적으로 남는다. 급성 췌장염은 담석, 음주, 고지혈증, 약물의 다양한 원인에 의해 샘파리세포(acinar cell)의 손상, 광범위한 간질부종, 출혈 및 손상 부위로의 호중성 백혈구의 이동 등을 유발하는 췌장의 염증성 질환이다. 이 질환의 약 80% 정도는 가벼운 임상 증상을 보이나 약 20% 정도는 췌장 조직의 괴사 및 폐 손상 등의 다발성 장기부전과 전신적인 합병증을 수반하는 중증의 임상 경과를 밟게 되며 이 경우 약 40%의 높은 사망률을 보인다[15,16]. 또한 재발성의 급성췌장염 발생은 샘파리세포 주변의 지방조직의 괴사, 섬유화, 도관의 형태적 기형을 유발한다고 보고하고 있다[17]. 만성 췌장염은 만성 음주나 특발 원인에 의해 췌장조직의 영구, 비가역 손상을 유발하여 췌장 석회화와 섬유화, 췌관 협착과 확장 등의 변화를 보이며 당뇨와 흡수장애의 내.외분비 기능 부전을 초래하는 질환이다[15,16]. 이렇듯 여러 가지 원인에 의해 유발될 수 있는 췌장 기능의 손상 중 섬유화는 췌장 실질조직이 소실되고

섬유물질로 재구성되어 심각한 기능 부전을 초래한다.

Dibutyltin dichloride (DBTC)는 흰쥐에서 급성 췌장염을 유발시키며[21], DBTC 투여군의 약 80% 정도는 만성 췌장염의 소견을 보인다. Merkord 등[22]에 의하면, DBTC를 6 mg/kg 투여하였을 때 쓸개이자관(biliopancreatic duct) 상피세포의 독성 괴사를 일으켰으며 이것이 도관 안으로 탈락되고 먼쪽 쓸개관(distal common bile duct)을 차단하는 마개(plug)를 형성하고, 투여 7일 후 단핵구가 췌장에 대규모 증식된 것이 관찰되었으며 28일 후에는 급성 염증으로 진행될 뿐만 아니라 흰쥐의 1/3에서 도관 주변과 세포사이간질의 섬유화 현상이 나타났으며, Sparmann 등[31]에 의하면, 흰쥐에 DBTC 8 mg/kg를 투여한지 7일째 섬유증 발달이 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서도 췌장의 섬유화를 실험적으로 유도하기 위하여 polyvinylchloride 제조에 안정화제로, 농업과 오염방지 페인트에 살생물제로 널리 이용되고 있는 organotin 화합물의 일종인 DBTC를 동물모델 실험에 이용하였다.

한편, 야콘(*Smallanthus sonchifolius*)은 남미 에콰도르와 페루가 원산지이며 국화과에 속하는 다년생 구근작물이다. 야콘 잎은 예전부터 페루인에게는 고혈당, 신장장애 그리고 피부재생을 위한 민간요법으로 이용되고 있다[34]. 최근 보고에 의하면, 야콘은 만성질환을 앓고 있는 환자, 다이어트 그리고 당뇨 환자의 식재료로 적당하다는 것이 임상 연구를 통해서 확인되었으며[33], Valentová & Ulrichová [32]에 의하면, 야콘 구근

*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2648, Fax : +82-54-770-2369

E-mail : inspark@dongguk.ac.kr

의 고혈당, 신장장애, 피부재생을 위한 섭취와 야콘잎의 항고혈당증과 세포보호 활성은 각각 oligofructon과 페놀화합물에 의한 것으로 보고하고 있다. 2% 야콘차를 streptozotocin으로 유도된 당뇨유발 흰쥐에게 30일 동안 투여하였을 경우 저혈당 효과가 있으며[2], 그 외 항산화 효과[33], 항균 효과[18] 그리고 항진균 효과[12] 등이 보고되고 있다. 또한 본 연구자의 앞선 실험에서 흰쥐에 DBTC 투여로 췌장염을 유발시킨 후 1% 야콘 추출물을 2주 동안 음용시킨 결과 췌장조직의 염증완화 효과를 확인하였으나[6], 야콘 추출물이 췌장조직의 섬유화에 미치는 영향은 보고된 바 없다.

그러므로 본 연구에서는 DBTC를 흰쥐의 정맥에 투여하여 췌장염을 유발시킨 후 췌장염의 섬유증 발달에 미치는 영향을 조직화학적 및 면역조직화학적 염색을 통해 비교 관찰하여 야콘잎 추출물이 췌장조직에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용된 동물은 230-250 g의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 대한실험동물센터로부터 구입하였으며, 일주일 동안 온도 22±1°C, 습도 55±3%인 실험실 환경에서 12시간 밤낮 주기로 적응시킨 후 실험군 당 8마리씩 나누어 사용하였다.

야콘잎 추출

충북 옥천군에서 열풍 건조된 잎을 구입하였으며, 잎과 증류수를 1:4 (w/v) 비율로 혼합하여 100°C에서 3시간 동안 열탕 추출하였다. 추출물을 여과한 후 감압 농축(N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 동결 건조시킨 다음, 건조된 분말을 1% 농도로 생수에 희석하여 음용시켰다.

췌장염 실험 모델

췌장염 유발을 위하여 dibutyltin dichloride (DBTC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 100% 에탄올과 글리세롤(2:1)에 섞어 본 실험에 사용된 수컷 흰쥐의 꼬리 정맥에 1회(8 mg/kg) 투여하였다. 실험 동물군은 DBTC 투여 후 생수를 음용시킨 군(유발군)과 DBTC 투여 7일 후부터 1% 야콘잎 추출물을 음용시킨 군(처리군)으로 나누어 관찰하였으며, DBTC를 투여하지 않고 생수를 음용시킨 군을 대조군으로 관찰하였다. 각 실험군은 7, 14, 21일째 희생하여 췌장 조직을 관찰하였다.

조직표본 준비

동물을 sodium pentobarbital (0.3 ml /100 g)로 마취시킨 후 복부를 절개하여 췌장을 채취한 후 얻어진 조직을 10% 중성 포르말린에 12시간 고정시킨 후 흐르는 물에 수세하였으며, 탈수화과정을 거친 다음 파라핀에 포매시켜 5 µm로 연속

절편하여 조직화학 및 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

조직화학 및 면역조직화학적 염색

절편된 조직 표본을 xylene을 이용하여 탈파라핀한 후 가수화(rehydration)하여 조직화학적 염색으로는, collagen 섬유가 적색으로 관찰되는 van Gieson 염색을 행하였다. 또한 면역조직화학적 염색으로는 탈파라핀한 후 가수화시킨 표본을 proteinase K (20 µg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 3% H₂O₂로 5분간 처리하여 조직내의 내인성 과산화효소를 제거하고, 1차 항체 즉, COX-2 (Santa cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), TGF-β1 (Santa cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), VEGF (Chemicon, Billerica, MA, USA)를 각각 처리하여 4°C humidified chamber에서 12시간 동안 반응시켰다. 그 후 0.02 M phosphate buffered saline (PBS)에 충분히 수세한 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, USA)에 실온에서 10분간 link하였다. PBS로 수세한 후 streptavidin peroxidase (DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, USA)에 10분간 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 발색 반응을 확인하였으며, Hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경(Carl Zeiss J/902344, Germany) 하에서 비교 관찰한 후 디지털 카메라 (Sony DSC-F707, Japan)로 촬영하였다. van-Gieson 염색 표본은 현미경 관찰 후 400배율에서 collagen 생성량을 이미지분석 (Image-Pro Plus, ver. 7.0)하였으며, 각 조직 표본당 3곳을 측정하여 통계 처리하였다.

통계처리

실험군 간의 유의성 검증을 위해 SPSS (ver. 17.0) program을 이용하였으며, one-way ANOVA로 분석하고 DUNCAN으로 사후 검증하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 판별하였다.

결 과

조직내의 collagen 변화

van Gieson 염색을 통해 관찰되는 collagen 형성 변화에 있어서, 대조군의 췌장조직은 큰 혈관과 도관 주변에서 관찰되었으며(Fig. 1A), DBTC 투여 7일 후에는 대조군에 비해 혈관 및 도관 주변에서 증가되었다(Fig. 1B). 투여 14일째는 썩파리세포의 괴사 진행으로 췌장조직의 손상이 초래되고 세포사이질공간이 증가되면서 그 공간으로 collagen이 축적되어져 가고 있었으며, 관찰 마지막인 투여 21일째의 유발군에서는 혈관과 도관뿐만 아니라 세포사이질의 새로운 조성으로 collagen이 다량 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 1C), 특히 사이질에는 염증관련 세포와 섬유모세포가 매우 증가되

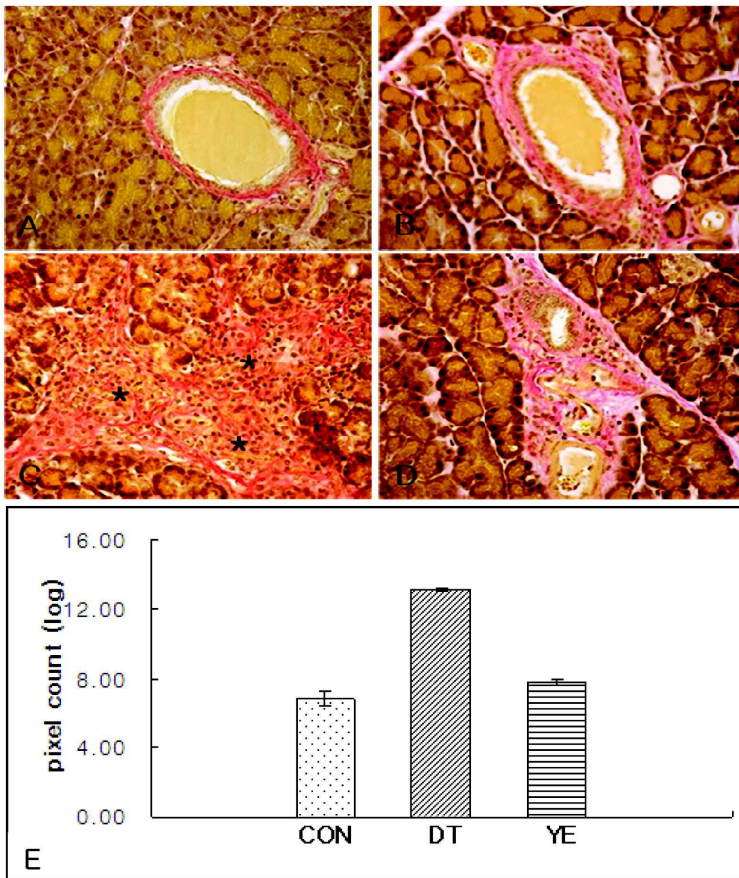


Fig. 1. Histochemical staining for van Gieson (x400). A is control group. Collagen was increased in duct and blood vessel after 7 days (B), and highly increased in pancreas (stars) after 21 days (C). It was inhibited in 1% yacon and DBTC treated group as compared to DBTC treated group after 21 days (D). E is image analysis of collagen by van Gieson stain on day 21. Differences were observed between the groups ($p < 0.001$). means \pm SE.

어있었다. 반면, 야콘추출물을 음용한 처리군에서는 DBTC 투여 14일째까지는 유발군과 큰 차이를 확인할 수 없었으나, 21일째 collagen 축적을 관찰한 결과 유발군에 비해 현저히 감소되었다(Fig. 1D). Fig. 1E에 나타난 이미지 분석을 통한 collagen의 변화에서도 DBTC 투여 21일째의 대조군, 유발군, 처리군이 각각 6.80 ± 0.43 , 13.13 ± 0.10 , 7.77 ± 0.21 로 측정되었으며 각 실험군 간에는 모두 유의적인 것으로 판별되었다 ($p < 0.001$). 유발군은 대조군과 처리군에 비해 매우 증가된 반면, 처리군은 유발군에 비해 현저히 감소되었으며, 이것은 야콘 추출물이 섬유화 진행을 억제하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

Cyclooxygenase-2 (COX-2)

대조군의 췌장조직에서 COX-2의 발현은 매우 약하거나 거의 발현되지 않았으나(Fig. 2A), DBTC 투여 7일째는 혈관의 내피세포 및 평활근세포와 도관의 평활근세포에서 양성 반응이 관찰되었으며(Fig. 2B), 간혹 샘파리세포에서도 약한 양성 반응이 관찰되었다. 이러한 발현은 14일째까지 유사하게 관찰되다가 21일째 발현이 더욱 증가되었다. 특히 이 증가된 발현은 췌장염으로 손상된 지역에 인접해 있는 샘파리세포에서 강한 양성 반응이 나타났으며, 뿐만 아니라 림프구, 섬유모세

포, 단핵구에서도 COX-2에 대한 양성 반응이 관찰되었으나, 이미 조직손상이 심한 곳은 샘파리세포에서의 발현이 매우 약하거나 나타나지 않았다(Fig. 2C). 반면, 처리군에서는, 14일째 샘파리세포에서 약한 양성 반응을 보이는 세포가 관찰되었으나 췌장염 유발 7일째에 관찰된 혈관과 도관의 평활근 세포에서의 양성반응은 증가되지 않은 것으로 관찰되어 처리군에서 COX-2 발현이 억제되었음을 알 수 있었다. 21일째 처리군에서는 혈관과 도관에서도 양성 반응을 보였으며 샘파리세포는 14일째 보다 강한 양성 반응을 나타내었으나, 침윤하는 염증세포에서는 양성 반응이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2D).

Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1)

췌장의 TGF- β 1에 대한 면역 반응을 관찰한 결과 대조군에서는 도관 세포를 제외한 대부분의 췌장 조직에서 거의 발현되지 않거나 매우 약하게 나타났으나(Fig. 3A), DBTC를 투여한 후 7일째 유발군에서는 도관과 혈관의 평활근세포와 내피세포에서 강한 양성 반응을 보였으며 샘파리세포에서는 간혹 약한 반응을 나타내었다. 14일째까지 도관과 혈관의 평활근세포와 내피세포에서는 강한 양성 반응을 나타낸 반면, 샘파리세포에서는 양성 반응을 나타내는 세포가 거의 증가되지 않았다(Fig. 3B). 관찰 21일째, 대부분의 췌장 조직에서는 현저히

감소된 반면, 결합조직에서 증식된 섬유모세포와 침윤한 단핵구에서 TGF-β1에 대한 양성반응을 쉽게 확인할 수 있었으며 (Fig. 3C), 이들 세포들에 의해 TGF-β1의 발현이 증가되었던 반면, 처리군에서는 14일째 도관과 혈관의 평활근세포와 내피세포에 양성 반응은 유발군과 유사하게 관찰되었으나 썬파리 세포에서는 소엽 가장자리에 위치한 세포가 유발군에 비해 강한 양성 반응을 나타내었다. 21일째 처리군에서는 도관과 혈관의 양성 반응이 14일째 보다 약한 발현을 보였으며, 대부분의 썬파리세포에서는 약한 양성반응을 나타내었고 특히, 소엽가장자리에 위치한 썬파리세포에서는 14일째 보다 강한 양성 반응을 나타내었다(Fig. 3D). TGF-β1의 발현 세포에서는 뚜렷한 차이가 확인되었는데, 유발군에서는 증식하고 있는 염증세포에서 현저한 발현증가 현상이 관찰되었고, 처리군에서

는 썬파리세포에서의 발현 증가 현상이 나타났다.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

췌장의 VEGF 발현에서, 대조군은 도관, 혈관 그리고 썬파리 세포의 세포질에서 양성 반응을 나타내었다(Fig. 4A). DBTC를 처리한 유발군에서는 7일째 대조군에 비해 증가된 발현을 보였으며, 이러한 반응은 14일째까지 지속되어 나타났다. 그러나, 21일째 유발군 췌장 조직에서의 VEGF 발현은 염증증이 심한 지역의 썬파리세포들에서 강한 발현이 나타난 것을 제외한 대부분의 썬파리세포에서는 감소되었거나, 결합조직에서 침윤하고 증식된 염증 반응을 나타내는 많은 세포들에서 VEGF가 발현되었다(Fig. 4B). 또한 도관과 혈관의 내피세포에서 처리군에 비해 강한 발현을 나타내었다(Fig. 4C). 이는

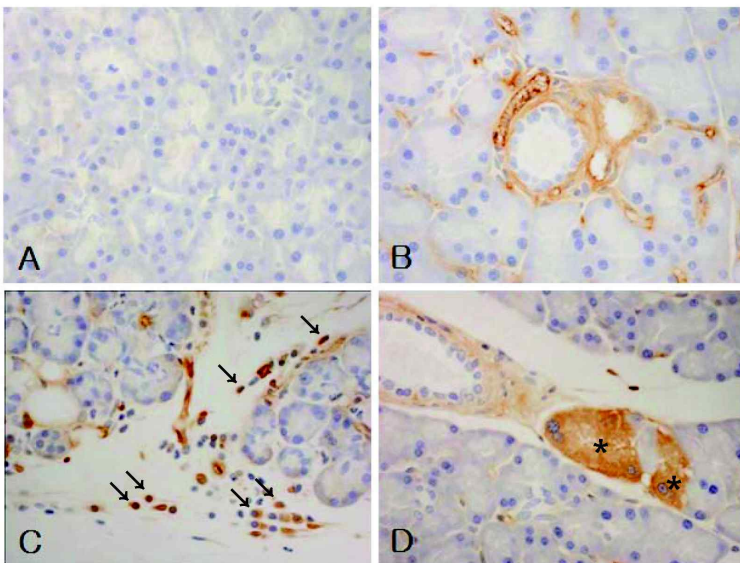


Fig. 2. Immunohistochemical staining for COX-2 in pancreas (x 400). COX-2 expression was not found in DBTC treated group (A). On day 7, the expression was detected in duct and blood vessel after DBTC treatment (B), and observed in inflammatory cells (arrows) after 21 days (C). However, the expression was decreased for 1% yacon and DBTC treated group as compared to DBTC treated group, whereas the strong expression of COX-2 in acinar cell (stars) was observed on day 21 (D).

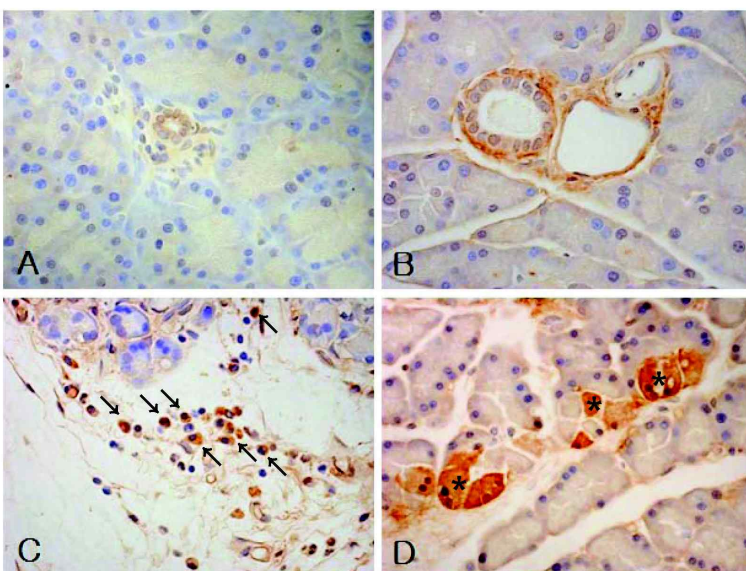


Fig. 3. Immunohistochemical staining for TGF-β1 in pancreas (x400). Weak or no expression of TGF-β1 was observed in control group (A). In DBTC treated group (DT) after 14 days, the expression was increased in duct and blood vessel (B), and showed in inflammatory cells (arrows) after 21 days (C). However, the expression was increased in acinar cells of 1% yacon (stars) and DBTC treated group (YE) as compared to DBTC treated group (D).

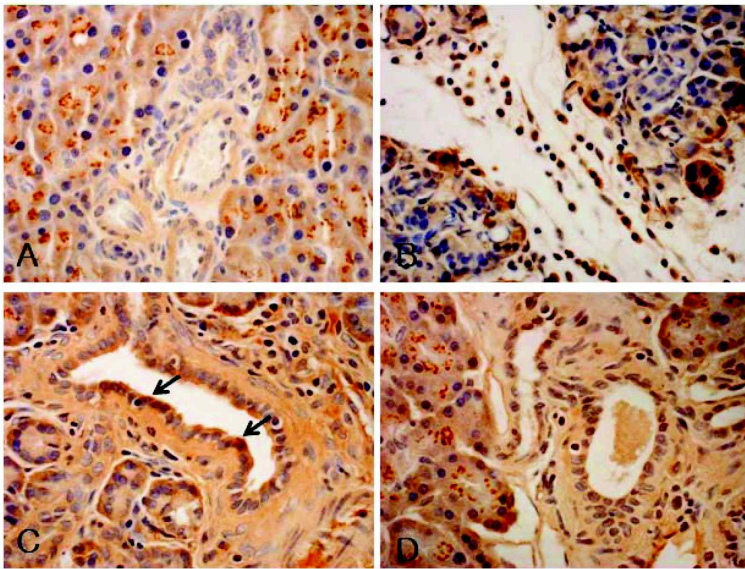


Fig. 4. Immunohistochemical staining for VEGF in pancreas after 21days (x400). VEGF expression was observed in most of cells in pancreas of control group (A). However, in DBTC treated group, the expression was observed in inflammatory cells (B), duct (arrows) and blood vessel (C), whereas the expression was decreased in 1% yacon and DBTC treated group as compared to DBTC treated group (D).

TGF-β1이 췌장에서 나타낸 발현과 유사하며 VEGF의 발현도 이들 염증 세포들에 의해 DBTC 투여 21일째에 증가된 것을 알 수 있었다. 처리군에서는, 14일째 유발균과 유사하게 도관과 혈관의 평활근세포와 내피세포에 양성 반응을 보였으며, 대부분의 샘파리세포에서 양성 반응을 나타내었다. 특히, 소엽 가장자리에 위치한 세포에서 강한 양성 반응을 나타내었으며, 21일째까지 강한 발현을 보였다. 그러나 21일째 유발균에서 관찰되었던 염증세포의 양성 반응이 처리군에서는 거의 관찰되지 않았으며, 도관과 혈관에서도 유발균에 비해 약한 반응이 나타났다(Fig. 4D). 이것은 VEGF의 발현이 TGF-β1의 발현과 유사한 경향을 나타내고 있는 것을 알 수 있었다.

고 찰

Sparmann 등[31]에 의하면 흰쥐에 DBTC (8 mg/kg)를 투여한지 24시간 후 급성 부종, 7일째는 호중성 백혈구, 단핵구의 증식과 섬유모세포의 수가 증가되고 가끔 샘파리세포의 괴사가 관찰되었으며, 14일째 도관주변에 결합조직이 침착되며 사이질로 퍼져나가는 것이 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구자의 앞선 실험 결과[13] 또한, 췌장염 유발 및 염증 진행 과정이 유사하게 나타났으며, 본 실험에서 van Gieson 염색을 통한 collagen 변화에서도 췌장조직의 사이질로 증식, 침투하는 단핵구 및 섬유모세포 증가와 비례하였으며, 이들 세포의 증가 현상은 collagen 형성에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 샘파리세포들의 괴사로 인해 collagen이 형성되어 조직의 재구성이 이루어 지고 있으나, 야콘추출물에 의해 그 현상들이 억제되고 있음을 확인할 수 있었다.

collagen 형성에 미치는 영향을 구체적으로 확인하기 위하여 면역조직화학적 연구를 통해 관찰하였다. Cyclooxygenase

(COX)는 COX-1과 COX-2의 두 개의 isoenzyme이 있으며, prostaglandins (PGs)의 합성을 조절하는 효소이기도하다. 또한 PGs는 섬유모세포 증식과 type I collagen 생성을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다[11]. COX 중 COX-1은 대부분의 세포에 널리 분포하고 있으며, COX-2는 사이토카인, 성장인자, 종양촉진인자 등의 여러 자극에 의해 유도되며[23,30], 주로 조직에서 PGs를 생성하여 염증과 통증을 유발하는 것으로 보고되고 있다[14]. Ethridge 등[9]에 의하면, 정상적인 췌장의 경우 COX-2 발현이 혈관의 평활근세포에서 낮게 나타났으며 샘파리세포에서는 확인되지 않았으나, cerulein으로 유도된 마우스의 췌장염에서는 전체 샘파리세포에서도 발현이 나타났으며 특히, 세포의 괴사와 염증이 일어난 지역 가까운 곳에 있는 샘파리세포에서 더욱 두드러진 발현 현상이 있었고, 이들 발현은 췌장염 유발 초기 동안 높은 발현율을 보였다고 한다. Ethridge 등[9]은 항염증 사이토카인인 TGF-β가 실험모델에서 급성 췌장염의 극심한 발병 진행을 감소시키는 것으로 보고하고 있으며[1,25,27], COX-2는 이들 사이토카인에 의해 억제되며, 췌장염으로 인한 염증 진행에 중요한 지표로 작용한다고 보고하였다. 본 실험에서 관찰한 COX-2 발현이 DBTC 처리 21일째 유발균에서는 증가를 확인할 수 있었으며 특히, 결합조직에 침윤한 염증관련 세포와 손상이 심한 지역의 샘파리세포에서 발현이 명확히 증가되었으나 처리군에서는 발현 감소를 보였다. 또한 샘파리세포에서 나타난 COX-2 발현이 유발균에서는 강하게 나타난 반면 TGF-β1의 발현은 거의 관찰되지 않았으며, 처리군의 경우는 샘파리세포에서의 COX-2 발현보다 TGF-β1의 발현이 유발균에 비해 강하게 관찰되었다. 이것은 Ethridge 등[9] 보고와 같이, 샘파리세포에서 TGF-β1이 COX-2의 발현을 억제시켜 염증 진행이 억제된 것으로 보인다. 그러나 결합조직에서 침윤, 증식하고 있는 섬유모세

포 및 염증관련세포들에는 염증이 진행될 수록 COX-2와 TGF- β 1이 증가되는 경향을 나타내었다. 이것은 TGF- β 1이 췌장의 썬파리세포에서와 결합조직 즉, 세포사이질 구성에 미치는 영향은 다르게 나타났다. TGF- β 1의 발현이 실질조직에서 세포보호 효과를 나타내는 반면 단핵구와 섬유모세포에서 발현되는 경우에는 또 다른 영향을 미친다.

세포사이질 구성 분포는 췌장에서 정상인 경우와 질병으로 인한 경우에 차이가 나며[19], 그 중 TGF- β 1은 섬유조직의 성장에 중요한 역할을 하고, 세포사이질 합성을 자극하고 그것의 퇴화를 억제한다[20]. TGF- β 1은 간경변, 사구체신염, 특발성 폐섬유증과 같은 몇몇 질병과정에서 섬유증 발달에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다[3,4,5]. 췌장에서의 섬유증은 세포괴사, 염증 또는 도관 폐색과 같은 과정에 의해 유발되며, 이것은 세포사이질 형성, 썬파리세포가 사라지거나 도관세포가 손상된 곳에서 나타나 결국, 췌장 소엽의 구조적 소실로 나타나게 된다. Sparmann 등[31]에 의하면 DBTC로 유도된 췌장염에서 7일째 섬유증 발달로 단핵구가 광범위하게 침윤되어 있었으며, messenger RNA-encoding collagen type I과 TGF- β 1의 상승도 보였다고 보고하였다. 또한 TGF- β 1이 췌장에서 collagen 합성을 이끄는 중요한 요소이며, Van Laethem 등[35]은 사람의 만성췌장염에서 단핵구, 섬유모세포, 몇몇 도관세포에서 TGF- β 1이 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서 유발군의 TGF- β 1 발현이 대조군과 처리군에 비해 강한 발현을 나타냈으며, 특히 유발 21일째군에서는 섬유화로 진행되면서 섬유모세포, 단핵구에서 TGF- β 1의 발현이 쉽게 관찰(Fig. 3C)된 반면, 처리군에서는 이러한 염증세포의 증가도 유발군에 비해 현저히 낮았을 뿐만 아니라 이들 세포에서의 TGF- β 1 발현도 거의 관찰되지 않았다. 이는 염증세포로부터 발현되는 TGF- β 1에 의해 collagen 합성이 유도되고 이로 인해 섬유화로 진행되는데 야콘추출물은 염증세포로부터 TGF- β 1의 발현을 억제함으로써 섬유화 진행을 억제하고 있음을 알 수 있다.

VEGF는 성체에서의 혈관 신생뿐만 아니라 배아 발생에서의 혈관 발달을 조절하는 중요한 인자로서, 포유동물에서는 현재 다섯 종류의 VEGF (VEGF-A, B, C, D, PLGF)가 밝혀져 있다. 이들은 VEGF 수용체-1, 2, 3으로 알려진 세 개의 수용체 타이로신 인산화효소(RTKs)와 heparan sulphate proteoglycans (HSPGs), neuropilins (NRPs) 등의 보조수용체들과 중복적으로 결합한다. 동맥벽에서 VEGF는 산화적인 스트레스와 angiotensin II를 포함하는 여러 가지 자극에 의해 혈관의 평활근 세포에서 생성되며, 내피세포의 기능을 조절한다. 또한 저산소증과 같은 특수한 스트레스적 조건하에서 내피세포에 의한 VEGF 생성이 활성화된다[29]. Mohle 등[24]에 의하면 VEGF는 평활근 세포의 증식과 이주 그리고 내피세포 조절에 중요한 역할을 하며, 평활근 세포를 비롯한 많은 세포들에 의해 합성될 수 있다고 보고하고 있다. Jo 등[13]은 혈관 형성과

정의 가장 초기에 작용하는 신호로써 VEGF의 발현이 가장 먼저 증가되고 이러한 VEGF는 혈장 단백질이 혈관밖으로 투과되기 용이하도록 혈관의 투과성을 증가시키고 종양세포와 혈관내피세포의 증식을 유도한다고 보고하고 있다. 몇몇 사이토카인 또는 성장인자는 VEGF mRNA 발현을 상향 조절 또는 VEGF 단백질 방출을 유도한다[10,26]. Dvorak 등[7,8]에 의하면 미세혈관의 투과성 증가는 종양 및 손상과 연관된 혈관신생에 있어 중요한 단계라고 제시하였다. 이 가설에 따르면, 혈관신생과정에서 VEGF의 주된 기능은 혈장단백질 누출의 유도이며 이러한 현상은 내피세포와 종양세포 성장을 위한 기질, 즉 혈관 밖의 fibrin gel 을 형성하게 된다는 것이다. 또한 Pertovaara 등[26]의 연구에 의하면, VEGF가 내피세포에서 천공(fenestration)을 유도하는 요인이 되는 것으로도 보고 있다[28]. 그리고 TGF- β 와 함께 상피세포와 섬유모세포주로 세포 배양 처리를 했을 때 배지에 VEGF mRNA 유도와 VEGF 단백질 방출이 있었고, TGF- β 자극은 혈관의 내피세포를 포함하고 있는 그들 주변의 세포간기질과 결합조직의 섬유모세포에서 VEGF 단백질의 생합성 축적을 일으킨다고 보고하였다. 본 실험에서, DBTC로 유도된 췌장염의 췌장 조직에서 유발군의 VEGF 발현은 TGF- β 1 발현과 유사하게 관찰되었으며, 이것은 TGF- β 1에 의해 VEGF 합성이 유도됨을 알 수 있다. 야콘추출물이 VEGF의 혈관투과성과 천공 형성에 미치는 영향은 앞으로 구체적인 연구가 필요한 것으로 사료되나, 본 실험에 나타난 결과에서 야콘추출물이 혈관투과성 증가 및 천공 형성을 억제시키는 것으로 사료된다. 도관과 혈관에서의 VEGF 발현이 유발군에 비해 처리군에서 감소된 것으로 보아 염증세포가 혈관에서 조직으로 침투하는 것을 억제함으로써 결국 염증관련세포들로부터 발현되는 TGF- β 1의 감소는 섬유화 진행을 억제시키는 것으로 추측할 수 있다.

그러므로 본 연구에서 야콘추출물이 섬유화 진행에 미치는 영향을 확인하기 위하여 COX-2, TGF- β 1 및 VEGF의 발현 및 collagen 형성을 확인한 결과, 흰쥐의 췌장염으로 인한 섬유화 진행을 억제하였으며, 이는 야콘추출물이 췌장염의 섬유화에 미치는 영향은 매우 효과적인 것으로 사료된다.

References

- Alaaeddine, N., Di Battista, J. A., Pelletier, J. P., Kiansa, K., Cloutier, J. M. and Martel-Pelletier, J. 1999. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. *Arthritis Rheum.* **42**, 710-718.
- Aybar, M. J., Sánchez Riera, A. N. S., Grau, A. and Sánchez, S. 2001. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smilax sonchifolia* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **74**, 125-132.

3. Border, W. A., Okuda, S., Languino, L. R., Sporn, M. B. and Ruoslahti, E. 1990. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature* **346**, 371-374.
4. Broekelmann, T. J., Limper, A. H., Colby, T. V. and McDonald, J. A. 1991. Transforming growth factor- β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6642-6646.
5. Castilla, A., Prito, J. and Fausto, N. 1991. Transforming growth factor β 1 and α in chronic liver disease: effects of interferon α therapy. *N. Engl. J. Med* **324**, 933-940.
6. Choi, N. H., Choi, S. H., Lim, S. W. and Park, I. S. 2007. The effect of yacon (smallanthus sonchifolius) extract against dibutyltin dichloride-induced pancreatitis. *The Korean J. Anat.* **40**, 259-266.
7. Dvorak, H. F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med* **315**, 1650-1658.
8. Dvorak, H. F., Harvey, V. S., Estrella, P., Brown, L. F., McDonagh, J. and Dvorak, A. M. 1987. Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab. Invest.* **57**, 673-686.
9. Ethridge, R. T., Chung, D. H., Slogoff, M., Ehlers, R. A., Rajaraman, M. R. S., Saito, H., Uchida, T. and Evers, M. 2002. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* **123**, 1311-1322.
10. Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25.
11. Frungieri, M. B., Raemsch, M. R. and Mayerhofe, A. 2005. The action of the mast cell product tryptase on cyclooxygenase-2 (COX2) and subsequent fibroblast proliferation involves activation of the extracellular signal-regulated kinase isoforms 1 and 2 (erk1/2). *Cellular Signalling* **17**, 525-533.
12. Inoue, A., Tamogami, S., Kato, H., Nakazato, Y., Akiyama, M., Kodama, O., Akatsuka, T. and Hashidoko, Y. 1995. Antifungal melampolides from leaf extracts of smallanthus sonchifolius. *Phytochemistry* **39**, 845-84.
13. Jo, Y. S., Moon, H. S., Chung, H. W., Kim, S. C. and Chun, S. H. 2006. The expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie-2 and vascular endothelial growth factor mRNA in normal ovary, benign ovarian cyst, and epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **17**, 134-141.
14. Kawamori, T., Rao, C. V., Seibert, K. and Reddy, B. S. 1998. Chemopreventive activity of elecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **58**, 409-412.
15. Kim, C. D. 2003. Current status of acute pancreatitis in Korea. *Korean J. Gastroenterol.* **42**, 1-11.
16. Kim, C. D. 2005. Pancreatitis-Etiology and Pathogenesis. *Korean J. Gastroenterol.* **46**, 321-332.
17. Kloppel, G. and Maillet, B. 1992. The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.* **420**, 1-4.
18. Lin, F., Hasegawa, M. and Kodama, O. 2003. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2154-2159.
19. Maquart, F., Gillery, X. P., Kalis, B. and Borel, J. P. 1994. Cytokines and fibrosis. *Eur. J. Dermatol.* **4**, 91-97.
20. McCartney-Francis, N. L. and Wahl, S. M. 1994. Transforming growth factor β : a matter of life and death. *J. Leukoc Biol.* **55**, 401-409.
21. Merckord, J. and Hennighausen, G. 1989. Acute pancreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichloride. *Exp. Pathol.* **36**, 59-62.
22. Merckord, J., Jonas, L., Weber, H., Kröning, G., Nizze, H. and Hennighausen, G. 1997. Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): Pathogenesis and natural course of lesions. *Pancreas.* **15**, 392-401.
23. Mitchell, I. A., Larkim, S. and Williams, T. J. 1995. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1535-1542.
24. Mohle, R., Green, D., Moore, M. A., Nachman, R. L. and Rafii, S. 1997. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 663-668.
25. Niuro, H., Otsuka, T., Ogami, E., Yamaoka, K., Nagano, S., Akahoshi, M., Nakashima, H., Arinobu, Y., Izuhara, K. and Niho, Y. 1998. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **250**, 200-205.
26. Pertovaara, L., Kaipainen, A., Mustonen, T., Orpana, A., Ferrara, N., Saksela, O. and Alitalo, K. 1994. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 6271-6274.
27. Reddy, S. T., Gilbert, R. S., Xie, W., Luner, S. and Herschman, H. R. 1994. TGF- β 1 inhibits both endotoxin-induced prostaglandin synthesis and expression of the TIS10/prostaglandin synthase 2 gene in murine macrophages. *J. Leukoc Biol.* **55**, 192-200.
28. Roberts, W. G. and Palade, G. 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* **108**, 2369-2379.
29. Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J. and Huot, J. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10661-10672.
30. Smith, W. C., Meade, E. A. and Dewitt, D. L. 1994. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. *Ann. NY Acad. Sci.* **714**, 136-142.
31. Sparmann, G., Merckord, J., Jäschke, A., Nizze, H., Jonas, L., Löhr, M., Liebe, S. and Emmrich, J. 1997. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin

- dichloride. *Gastroenterology* **112**, 1664-1672.
32. Valentová, K. and Ulrichová, J. 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. *Bioméd Papers* **147**, 119-130.
33. Valentová, K., Frček, J., and Ulrichová, J. 2001. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and Maca (*Lepidium meyenii*), traditional Andean crops as new functional foods on the European market. *Chem. Listy* **95**, 594-601.
34. Valentova, K., Cvak, L., Muck, A., Ulrichova, J. and Simanek, V. 2003. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *Eur. J. Nutr.* **42**, 61-66.
35. Van Laethem, J. L., Deviere, J., Resibois, A., Rickaert, F., Vertongen, P., Ohtani, H., Cremer, M., Miyazono, K. and Robberecht, P. 1995. Localization of transforming growth factor β 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **108**, 1873-1881.

초록 : 야콘(*Smallanthus sonchifolius*) 추출물이 흰쥐의 췌장 섬유화에 미치는 영향

최난희¹ · 김종봉² · 김진택¹ · 박인식^{1*}

(¹동국대학교 한의과대학 해부학교실, ²대구가톨릭대학교 의생명과학과)

야콘(*Smallanthus sonchifolius*)은 저혈당에 민간요법으로 이용해 오고 있는 구근작물이다. 최근에는 야콘잎이 항산화, 항균, 항진균 활성과 세포보호 기능이 있다고 보고되고 있다. 본 실험에서는 이러한 생리활성을 지니는 야콘잎을 이용하여 흰쥐에 DBTC (8 mg/kg)를 주사하여 췌장염을 유발시킨 후 1% 야콘추출물이 췌장의 섬유화에 미치는 영향을 연구하였다. 유발 21일째 처리군에서 췌장의 실질조직의 많은 부분이 collagen으로 재구성되어 있었으나 유발군에서는 처리군에 비해 현저히 감소되어 있었다. COX-2 발현에서, 대조군은 반응이 나타나지 않거나 매우 약한 반응이었으나, 유발군에서는 14일째 매우 증가되었으며, 특히 21일째는 침윤하고 있는 많은 염증세포에서 COX-2의 발현이 확인되었다. 처리군은 유발군에 비해 발현이 감소되었다. TGF- β 1 발현은 21일째 염증세포에서는 유발군이 처리군에 비해 현저한 증가 현상이 나타났으나, 샘파리세포에서의 TGF- β 1의 발현은 처리군에서 증가되었다. VEGF 발현은 TGF- β 1의 발현과 거의 유사한 경향으로 나타났다. 그러므로 야콘추출물이 DBTC로 유도된 췌장염의 섬유화 진행을 억제하는데 매우 효과적임을 확인하였다.