

茵陳분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향

이종훈, 김영철, 이장훈, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of five kinds of *Artemisia capillaris* T_{HUNB} fractions on Cell Viability, Cell Cycle Progression and Fas-mediated Apoptosis of HepG2 Cells

Jong-Hoon Yi, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

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

Objective : This study was carried out to examine the effect of five fractions of an aqueous extract from *Artemisia capillaris* T_{HUNB}.

Methods : The queous extract from *Artemisia capillaris* T_{HUNB} was fractionized into 5 kinds of material. We observed the effect of each fractions on etoposide-induced apoptosis, cell viability, cell cycle progression and mRNA expression of apoptosis-related genes in human hepatocyte cell line HepG2.

Results and Conclusions : The data shows that butanol fraction of *Artemisia capillaris* T_{HUNB} has no relation with cell cycle, however, it inhibits apoptosis significantly and the action may be due to the suppression of Fas and Bax genes and activation of Bcl-2 gene.

Key Word : *Artemisia capillaris* T_{HUNB}, Apoptosis, Fas, Bax, Bcl-2

I. 緒 論

우리나라 통계청 자료에 의하면, 사회적으로 가장 활발히 활동하는 연령층인 40대에서 각종 간질환으로 인한 사망률이 가장 높고, 특히 간암으로 인한 사망률은 인구 10만명당 21.4명(남32.6명, 여:10.0명)으로 세계보건통계연감에 발표된 나라 중 가장 높은 것으로 나타났다¹⁾. 따라서 우리나라에서 만연되고 있는 간질환은 국민건강의 측면에서 시급히 해결해야 할 사회적 문제이다.

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

과 관련된 증후들은 주로 黃疸門에 자세히 기술되어 있다. A.D. 200년경에 張仲景은 黃疸의 다양한 증후를 관찰하였고, 黃疸의 예후는 18일이라는 기간과 口渴의 여부 등에 따라 판정했다²⁾. 黃疸의 주된 原因으로는 濕熱熏蒸, 寒濕在裏 등을 들 수 있고, 治法으로는 清熱利濕이 根幹이 되고, 대표적인 치료처방은 茵陳五苓散 등 다양하게 적용되어 왔는데, 그 구성약물 중 茵陳이 君藥으로 사용되어 왔다.

현재까지 茵陳을 主材로 한 처방들의 효능에 관한 임상적, 실험적 연구는 계속되어 왔으나 그 처방들의 주약인 茵陳이라는 개별약물에 대해 세포주기에

미치는 영향이나 간보호작용의 기전에 대한 연구는 아직 미흡하며, 더구나 그 분획물에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 이에 저자는 茵陳이 인체 간세포에 미치는 영향을 알아보기 위해, 茵陳의 각 분획물이 apoptosis에 미치는 영향과, 세포주기에 미치는 영향을 관찰해보았다.

II. 材料 및 方法

1. 시약

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue, Etoposide: DNA damaging agent, Solutions: Hexane, Chloroform, Ethylacetate, Butanol,

H₂O, DMSO

2. 세포

사람의 간암세포주인 HepG2는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구했으며, 10% fetal bovine serum을 보충한 DMEM(Gibco)에서 보관했다. 세포는 습기찬 5% CO₂ 환경에서 37°C에서 길러졌다.

3. 인진분획물의 준비

인진은 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입하였으며 615g을 80°C의 물 증탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기 (Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 70.6g의 건조추출물을 얻어 11.48%의 수율을 보였다.

위에서 얻은 인진 중 30g을 이용하여, 1차 추출용매인 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, H₂O의 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 200ml를 넣고 분리한다. 하층을 모아 chloroform을 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 다시 2차

추출용매인 DMSO, chloroform, butanol, H₂O를 이용하여 다시 녹여서 100mg/ml의 농도로 stock solution을 제작하였다.

4. 간세포에 대한 약물처리

동결건조된 약제 100mg을 1ml의 용매(hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, H₂O)에 녹여, 멸균된 약물을 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml의 농도로 투여하고 각각 6시간, 12시간, 24시간, 48시간이 경과한 후 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 protein, DNA, RNA를 추출하였다. 간세포에 대한 약물 손상의 유발은 DNA damaging agent인 etoposide를 10µM의 농도로 12시간 자극한 후 한약제제에 의한 효능검사를 시행하였다.

5. MTT Assay

MTT 5mg/ml을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22µm의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 10⁴개의 세포를 포함하고 있는 100µl의 cell suspension에 10µl의 MTT stock solution을 첨가하였다.

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

6. Cell Cycle 분석

Cells pellete(5x10⁶)를 0.2ml PBS

에 현탁시킨 후 2ml of ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정시킨다. PBS에 강력하게 재현탁시킨 후 100µg/ml RNase 와 40µg/ml Propidium iodide(PI)가 포함된 PBS에서 37°C로 30분간 배양한다. FACScan을 이용하여 DNA의 양을 정량한다.

7. Cpp32 Protease Activity Assay

100µl의 lysis buffer(0.5%NP-40, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl and 50mM Tris, pH7.5)에 세포(7x10⁵ cells)를 용해시킨후 15000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한다. 20µl의 cell lysate와 180µl의 reaction buffer(100mM, pH 7.5 HEPES, 20% Glycerol, 5mM DTT, 5mM EDTA, and 100µM Peptide substrate)에서 37°C에서 배양한다. 405nm에서 ELISA reader를 이용하여 OD값의 변화곡선을 얻는다.

8. Quantitative RT-PCR

모든 RNA를 single-step method에 의해 배양된 세포로부터 추출해낸다. 추출된 1µg의 RNA를 MoMuLV (Gibco)와 random hexamer primers를 이용해서 cDNA로 역전사시킨다. PCR에 앞서 각각의 RNA로부터 분리된 2가닥의 cDNA를 1:4 또는 1:8로 증류수와 섞는다. PCR의 각 사이클은 95°C의 denaturation(1 min), 58-62°C의 annealing(45 sec)과 72°C의 extension(1 min)이다.

9. Densitometry를 통한 분석 (RT-PCR에서 나온 물질에 대해)

IBM호환 컴퓨터에서 Molecular Analyst program(version 2.0)을 이용

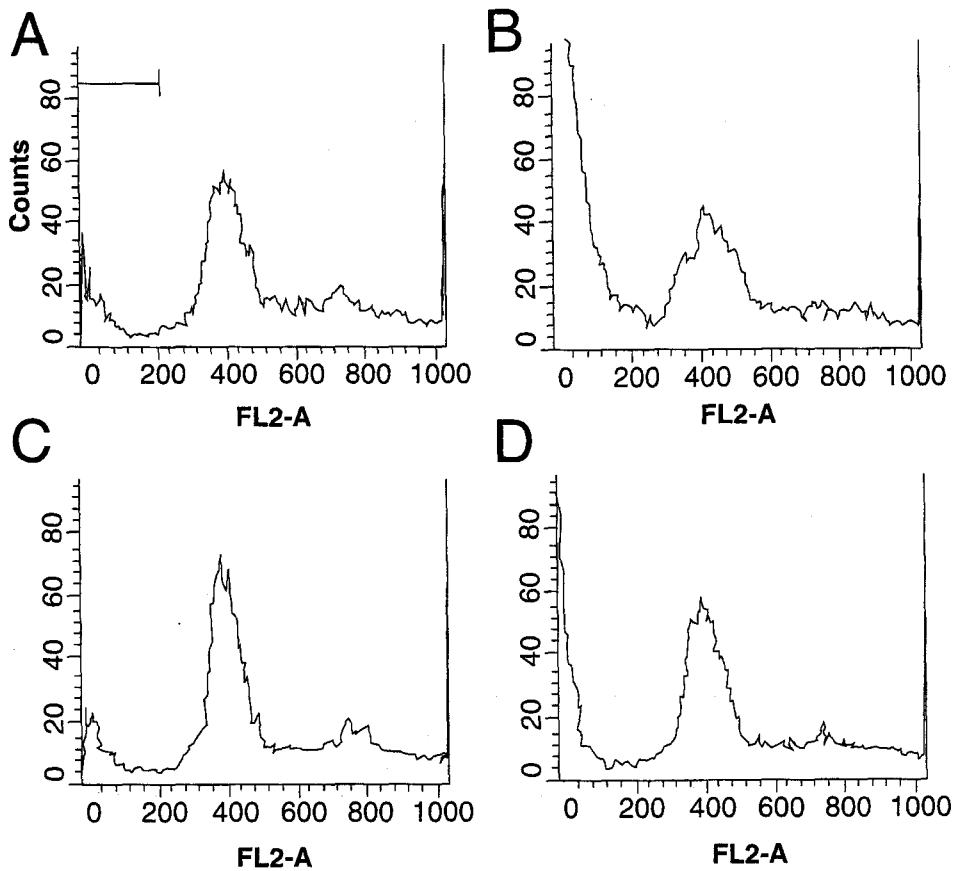


Fig 1. A:Control(No Fas-antibody) B:Untreated(Fas-antibody only)
C: Butanol fraction D: H₂O fraction

Table 1. Quantitive RT-PCR by Densitometry Scanning(gene/GAPDH)

Gene/GAPDH	12hrs	24hrs	48hrs
Fas	1.500±0.254	0.785±0.106	0.600±0.028
Bax	1.500±0.056	0.980±0.155	0.915±0.148
Bcl-2	1.145±0.134	1.515±0.190	1.715±0.077
Cpp32	1.210±0.212	1.255±0.205	1.175±0.304

한 laser densitometer(Bio-Rad)를 통해서 신호의 강도를 분석했다(Table 1).

III. 結果

MTT assay의 결과에서 인진의 butanol fraction 투여군은 뚜렷한 활성 증가를 보였다. 또한, etoposide 처리군

과의 비교에서도 butanol, H₂O, chloroform fraction에서 활성증가를 보였으나, 특히 butanol fraction에서의 증가가 현저하였다. 이는 butanol fraction의 간세포보호 효과가 뚜렷함을 나타낸다. Cell cycle analysis의 결과 인진의 각 분획물들이 세포주기에는 영향을 미치지 않았다.

DNA fragmentation assay의 결과 인진의 butanol 및 H₂O fraction이 유의성있게 apoptosis를 억제하는 효과가 있었다. Cpp32 protease activity assay 결과 인진의 butanol 및 H₂O fraction이 Cpp32 protease의 activity를 저하시켰으며, 특히 butanol fraction에서 이러한 효과가 두드러졌다(Fig.1).

위의 표(Table 1.)와 그림(Fig.2.)에 나타난 결과를 요약하면 butanol fraction은 Fas 및 Bax gene을 억제하며, Bcl-2는 증가시킨다. 또한 Cpp32에는 아무런 영향을 미치지 않는다. 결국, 앞의 Cpp32 protease activity assay에서는 활성억제효과가 나타났으나, RT-

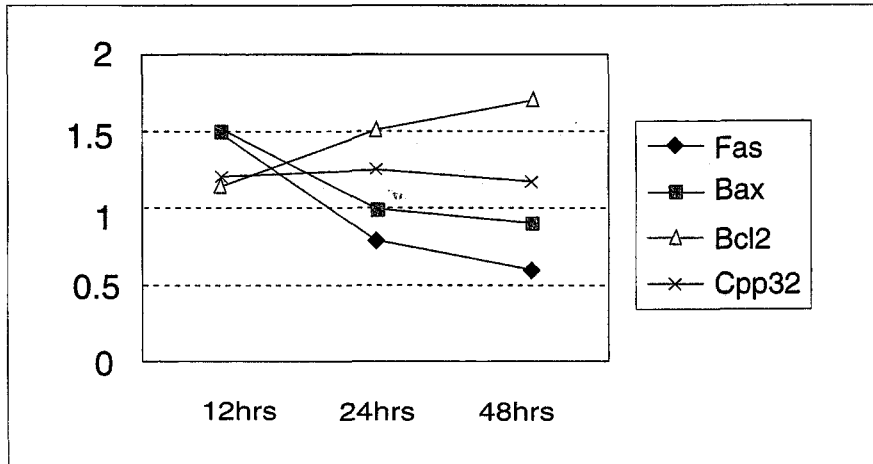


Fig. 2. Quantitative RT-PCR by densitometry scanning(gene/GAPDH)

PCR에서는 gene 발현억제가 나타나지 않았다. 이는 인진의 butanol fraction 이 Cpp32의 발현을 억제하지는 못하지만, 활성억제는 하고 있다는 의미이다.

이상을 종합해보면, 인진의 butanol fraction은 HepG2 cell의 apoptosis를

gene regulation을 통해 억제하고 있다는 것을 의미한다.

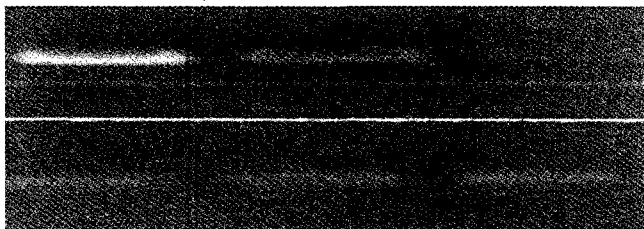
Quantitative RT-PCR을 시행한 2회의 실험 중 2번째 실험에서 얻은 사진은 다음과 같다.

IV. 考 察

1972년 Kerr 등³⁾은 apoptosis를 세포위축(cell shrinkage), 핵의 분절화(nuclear fragmentation), 세포질의 발아(cytoplasmic budding), apoptotic body의 형성(formation of apoptotic bodies)으로 정의하였으며, 이것은 암, 바이러스성 질환, AIDS 등 광범위한 질병에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다.

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 body 형성, 핵의 염색질 농축, DNA 단편화 등이 일어나고, 죽은

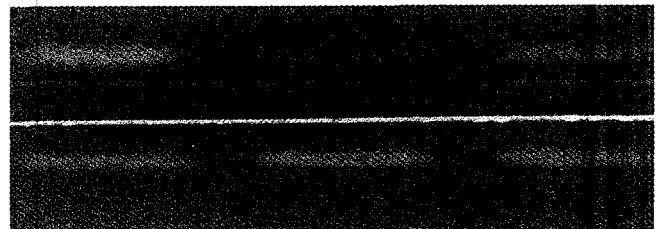
1) Fas expression



12hrs(=1.32) 24hrs(=0.71) 48hrs(=0.58)

Fig. 3. Fas and GAPDH expression (=Fas/GAPDH) (Butanol fraction with 100 μ g/ml)

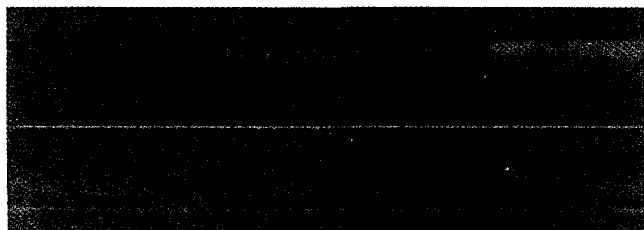
2) Bax expression



12hrs(=1.46) 24hrs(=0.87) 48hrs(=0.81)

Fig. 4. Bax and GAPDH expression(=Bax/GAPDH) (Butanol fraction with 100 μ g/ml)

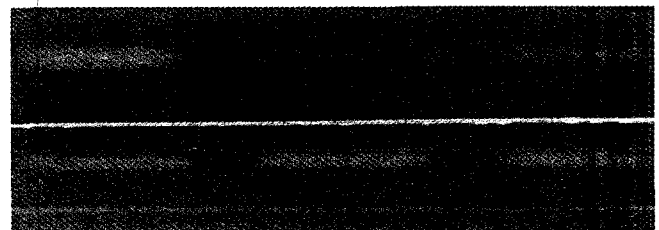
3) Bcl-2 expression



12hrs(=1.05) 24hrs(=1.38) 48hrs(=1.66)

Fig. 5. Bcl-2 and GAPDH expression(=Bcl-2/GAPDH) (Butanol fraction with 100 μ g/ml)

4) Cpp32 expression



12hrs(=1.05) 24hrs(=1.38) 48hrs(=1.66)

Fig. 6. Cpp32 and GAPDH expression(=Bcl-2/GAPDH) (Butanol fraction with 100 μ g/ml)

세포는 이웃 세포의 대식작용에 의해 사라지게 된다.

Fas는 TNF-receptor family에 속하는 유전자로 apoptosis를 일으킨다. 만약 간세포가 Fas-antibody에 의해 자극 되면 apoptosis가 유발된다. Cytotoxic T lymphocytes(CTL)에 의해 면역반응이 일어날 때도 apoptosis는 중요한 역할을 한다⁴⁾.

Bax는 Bcl-2와 비슷한 구조를 가지고 있지만 Bcl-2와 결합해서 오히려 Bcl-2를 억제한다⁵⁾. Bcl-2(B-cell lymphoma-leukemia-2)는 분자량 26kD의 protein으로서 chemoresistance에 중요한 역할을 담당하여 여러 종류의 자극에 대해 apoptosis를 block하는 특이 기능을 가지고 있다고 알려져 있다⁶⁾.

RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)은 전통적으로 특정 유전자의 RNA분석에 사용된 Northern blot의 문제점을 극복하는 방법이다^{7,8,9)}. 기존 Northern blot방법의 단점인 일개 유전자분석에 5~10 μ g의 RNA를 필요로 한다는 점과 동위원소의 사용이 필수적이라는 문제점을 해결한 방법으로 미량(1 μ g이하)의 RNA만으로도 특정 유전자의 분석이 가능하기 때문에 민감도가 뛰어나며, 동위원소의 사용이 필요하지 않다는 점 때문에 최근 대부분의 분자생물학적 연구에 사용되어지고 있다. 그러나 세포 또는 조직 속에 존재하는 핵산의 template가 100만배 이상으로 증폭된다는 사실로 인하여 정량분석은 PCR시행 후에 그 product의 전기영동상의 DNA-band의 강도만으로 결과를 서로 비교할 수 없는 단점은 계속적으로 가지고 있다. 최근에는 표준 RNA를 이용하여 한 시험관에서 역전사가 일어나게 한 후 그

cDNA를 차례로 희석하고 각각을 PCR로 증폭하여 영상밀도계(densitometer)로서 정량화하는 방법등을 이용하여 mRNA 정량방법을 확립하여 단점을 보완하였다^{8,10)}.

본 실험에 사용된茵陳은茵陳五苓散의 主藥이며, 현재도 임상에서 만성간질환의 치료에 淸熱利濕을 목표로 널리 사용되고 있다.茵陳은 국화과의 여러해살이풀 사철쭉 Artemisia capillaris THUNB.의 어린 싹이며, 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 있다¹¹⁾. 약리작용으로는 담즙분비촉진작용, 간 기능 보호작용 특히 간세포의 재생 작용이 탁월하다. 지질의 분해작용, 관상동맥 확장 작용과 혈압 강하 작용이 나타나고, 해열, 이뇨, 항균작용도 보인다¹²⁾.

茵陳을 主藥으로 하는 處方들에 대한 최근의 연구물을 살펴보면,茵陳四苓散에 대한 연구로, 禹¹³⁾는茵陳五苓散과茵陳增量한 構成方이 흰쥐 손상간에 미치는 영향을 보고하였고, 李¹⁴⁾는茵陳四苓散 등茵陳을 主材로 한 몇 종류의 처방이 실험적 간손상에 대해 간보호작용과 이담작용 및 지질강하작용 등의 효능이 있음을 보고하였다.茵陳淸肝湯에 대한 연구로는, 金¹⁵⁾이茵陳淸肝湯의 안전성에 관한 연구에서 급성·아급성·만성 경구독성 및 어떠한 부작용도 나타내지 않았다고 보고하였으며, 최근의 한약의 간보호효과에 대한 면역학적·유전학적 연구물들로는, 朴¹⁶⁾이茵陳淸肝湯加味方이 간세포보호작용 및 Bcl-2, Bcl-XL의 활성을 높여 세포사망을 억제하는 효과를 보고하였고, 洪¹⁷⁾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 보고하였다. 또, 姜¹⁸⁾은茵陳과茵陳四苓散加減方이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향을, 表¹⁹⁾는茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 연구하여 유의성있는 결과를 얻은 바 있다

V. 結 論

이 실험을 통해 우리는 인진의 butanol fraction과 H₂O fraction, 특히 butanol fraction이세포주기에 작용하면서 Fas mediated apoptosis를 강력히 억제하여, 세포 활성은 높이면서 손상은 막아 간기능을 보호하는 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 이러한 효과의 기전은 주로 apoptosis를 유발하는 Fas 및 Bax gene의 억제에 의한 것으로 생각되어졌다. 이러한 결과는 인진 분획을 임상에서 각종 간질환에 다양하게 사용할 수 있는 근거를 제시하고 있으며, 뛰어난 간세포보호효과를 가진 신약 개발 가능성을 제시한 것으로 사료된다.

VI. 參 考 文 獻

1. 통계청. 96년도 사망원인통계결과. 서울:1997,p.20-40.
2. 張仲景. 仲景全書. 서울:高文社;1984, p.225, 408-11.
3. Kerr JF, Willie AH, Currie AR. Apoptosis; a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J cancer* 1971;26: 239-57.
4. Nagata S, Goldstein P.. The fas death factor. *Science* 1995;267:1449-56.
5. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ.. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with

- a conserved homolog box that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
6. Hockenbery D, Nenez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-36.
 7. 김대곤, 임수일, 안득수. Hep G2 간암세포주에서 Retinoic Acid가 p53 단백질, Ki-67 및 PCNA/Cyclin 발현에 미치는 효과, 전주, *대한내과학회지*. 1995; 49(2):210-20.
 8. Ferre F.. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth, *PCR Methods and Applications*. 1992;2:1-9.
 9. Wang A. M. W., Doyle M. V., and Mark D. F.. Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86(24):9717-21.
 10. 정현채, 김정목, 송인성, 김정룡. 인체 대장 상피세포 및 대장점막에 발현된 여러 Cytokine 유전자의 정량분석을 통한 인체 숙주 방어기전에 관한 연구-합성 RNA를 이용한 정량적 역전사 PCR법의 응용. *대한내과학회지*. 1995;49(1):1-13.
 11. 안덕균. 원색한국본초도감, 서울:교학사;1998, p.112.
 12. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해, 서울:한국메디칼인텍스사;1998,p.638.
 13. 우홍정.茵陳五苓散과茵陳증량한 구성방이 흰쥐 손상간에 미치는 영향. *대한한의학회지* 1992;13(1):234-41
 14. 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;p.123-65.
 15. 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳清肝湯의 안전성에 관한 연구. *경희한의대논문집*, 1997;20(1):57-89.
 16. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳清肝湯加味方이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. *대한한의학회지*, 1998;19(1):145-64.
 17. 홍상훈, 이장훈, 우홍정.茵陳青肝湯加味方이 간세포활성, 세포주기 및 Apoptosis에 미치는 영향. *대한한의학회지*. 1998;19(2):337-72.
 18. 강우성, 이장훈, 우홍정. 인진과茵陳四苓散加減方이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced Apoptosis에 미치는 영향. *대한한의학회지*. 1999;20(1):91-105.
 19. 표임정, 이장훈, 우홍정.茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향. *경희한의대논문집*. 1999;22(1):119-40.