

생약혼합물이 사이토카인에 의한 갑상선세포의 Apoptosis에 미치는 영향

남경수 · 손옥례 · 김미경 · 박인경 · 김철호¹ · 조현국² · 전병훈³ · 손윤희*

동국대학교 난치병한양방치료연구센터 및 의과대학 약리학교실

¹동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실

²경운대학교 안경과학과, ³원광대학교 한의학대학 병리학교실

Effect of Medicinal Plants on Cytokine-induced Apoptosis in Thyroid Cells

Kyung-Soo Nam, Ok-Lye Son, Mee-Kyung Kim, In-Kyung Park, Cheorl-Ho Kim¹,
Hyun-Gug Cho², Byung-Hun Jeon³, and Yun-Hee Shon*

Intractable Disease Research Center and Department of Pharmacology,
College of Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine,
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

²Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gumi 730-852, Korea

³Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract – Apoptosis plays an important role in autoimmune chronic (Hashimoto's) thyroiditis, a disorder that often results in hypothyroidism. The goal of this study was to induce apoptosis by the combination of inflammatory cytokines, interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α , and to investigate a potential role of medicinal plants in the thyroid follicular cells (FRTL) *in vitro*. The apoptosis was evaluated by cellular viability, DNA fragmentation, and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL) assay. Extract of Gamgung-tang (GGT, Glycyrrhizae Radix, black beans, Angelicae Radix, and Cnidii Rhizoma) (0.3~9.0 mg/ml) was shown to maintain the viability of cells treated with IFN- γ (100 U/ml) and TNF- α (0.5 ng/ml). FRTL cells were found to undergo DNA fragmentation with the inflammatory cytokines. The extract of GGT inhibited DNA fragmentation in dose-dependent manner. The cells with TUNEL-positive nuclei were detected with IFN- γ and TNF- α treatment. The number of TUNEL-positive cells decreased with the treatment of extract of GGT. These results indicate that medicinal plants inhibit the occurrence of apoptosis in thyroid follicular cells, therefore, may have therapeutic potential in the treatment of autoimmune chronic thyroiditis.

Key words – Apoptosis, medicinal plants, autoimmune chronic thyroiditis, hypothyroidism, cytokine, DNA fragmentation, TUNEL

갑상선 자가면역질환은 갑상선세포의 항원에 대한 세포성 반응과 체액성반응으로 나타나는 질환으로 이러한 자가면역 반응에 의하여 갑상선 자가면역질환인 하시모토갑상선염 (Hashimoto's thyroiditis)에서는 갑상선기능저하증(hypothyroidism)이 나타난다. 전 인구의 2%가 하시모토갑상선염을 가지고 있으며 중년여성에게서 많이 발생하는 장기특이 자가면역질환이다.¹⁾ 갑상선세포의 파괴와 갑상선의 위축은 사람이나 실험동물의 갑상선기능저하증에서 나타나는 뚜렷한 특

징이지만 그 기전에 대해서는 완전히 이해되지 않고 있으며 갑상선세포의 파괴에 apoptosis가 주요한 역할을 한다는 보고들이 있었다.^{2,3)} 또한 자가면역 갑상선기능저하증의 병리현상에는 사이토카인이 관여한다고 알려져 있으며, 특히 하시모토갑상선염에서는 환자의 갑상선에서 분리한 T 세포로부터 IFN- γ 과 TNF- α 의 분비가 증가한다는 것이 보고되었다.^{4,6)}

감궁탕 (Gamgung-tang, GGT)은 감초, 흑두, 당귀 및 천궁으로 구성된 복방으로 감궁탕가미방이 갑상선 기능장애에 효능이 있음을 보고하였으며,⁷⁾ 감궁탕과 갑상선기능저하증의 자가항체와의 상관성에 관한 연구도 보고되었다.⁸⁾

*교신저자(E-mail) : yhshon@dongguk.ac.kr
(FAX) : 054-770-2477

특히 본 저자는 감궁탕이 흰쥐 갑상선세포에서 염증성 사이토카인에 의한 MHC class antigen의 발현과 세포독성 억제 효능이 있는 것을 증명하였으므로⁹⁾ 본 연구에서는 사이토카인(IFN- γ 과 TNF- α)에 의한 갑상선세포(FRTL)의 apoptosis 유도과 감궁탕이 사이토카인에 의해 유도된 apoptosis에 미치는 영향을 세포 생존력, DNA fragmentation, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL) assay로 살펴보았다.

재료 및 방법

시약 - Coon's modified Ham's F-12 medium, insulin, transferrin, glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate, somatostatin, hydrocortisone, thyroid stimulating hormone (TSH), collagenase, trypsin, chick serum, trypan blue, 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), actinomycin D, Tris-HCl, EDTA, Triton X-100, perchloric acid, diphenylamine, sulfuric acid, glacial acetic acid, acetaldehyde는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 흰쥐의 IFN- γ , TNF- α 와 apoptosis detection kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, newborn calf serum은 Join Bio-Innovation사 (Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 기타 시약은 세포 배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

시료제조 - 감초, 흑두, 당귀와 천궁은 동국대학교 부속한방병원에서 구입하였고, voucher specimens은 동국대학교 난치병한약방치료연구소에 보관되어 있다. 감궁탕 재료(감초 15 g, 흑두 15 g, 당귀 15 g, 천궁 15 g) 60 g에 3차 증류수 400 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BÜCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 200 ml가 되도록 감압농축하고 ethanol을 가하여 75%, 85%와 95% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하고 여액을 pH 7.4로 조절하였다. 여과된 시료는 freezer dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량 (30 mg/ml)을 측정하였다. 그리고 실험 조건에 사용되는 배지 및 증류수에 희석시켜 실험에 사용하였다.

세포배양 - Fischer 흰쥐의 갑상선에서 분리한 갑상선세포 FRTL 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여, 5% calf serum과 여섯 종류의 호르몬 [insulin (10 μ g/ml), transferrin (5 μ g/ml), glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate (10 ng/ml), somatostatin (10 ng/ml), hydrocortisone (10 nM)과 thyroid stimulating hormone (TSH, 10 mU/ml)]이 포함된 Coon's modified Ham's F-12 배지를 배양액으로 하여 CO₂ 배양기(5% CO₂

37°C)에서 배양하였다. 이 세포는 액체질소의 기체상태(-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였다.

FRTL 세포주의 생존력 - FRTL (1 \times 10⁴ cells/well)를 96-well plate에 접종시켜 CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 배양액을 버리고 IFN- γ (0~500 U/ml), TNF- α (0~25 ng/ml) 또는 IFN- γ (100 U/ml)과 TNF- α (0~25 ng/ml) 및 감궁탕 (0~9 mg/ml)이 포함된 새 배양액을 각 well에 가하고 세포의 생존력을 IFN- γ 은 48시간 후에 TNF- α 는 24시간 후에 MTT assay로 측정하였다.

DNA fragmentation 분석 - 2.5 \times 10⁴의 FRTL 세포를 5 ml의 배지에 부유시켜 6-well plate에 접종시키고 세포 배양기에서 배양하였다. 18시간 경과 후 배지를 교환하여 cytokine [IFN- γ (100 U/ml)와 TNF- α (0.5 ng/ml)]과 농도별 (0, 0.3, 1.5, 3.0과 9.0 mg/ml) 감궁탕을 처리하여 48시간 배양한 후, 세포에서의 DNA 절편화현상을 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 처리한 세포를 well로부터 떼어내어 회수한 후 차가운 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8.0)에서 분쇄하였다. 분쇄물은 침전물의 chromatin과 상층액의 fragmented DNA를 분리하기 위하여 27,000 \times g에서 20분간 원심분리하였다. 침전물은 0.5 N perchloric acid로 부유시키고 상층액은 높은 농도의 perchloric acid를 첨가하여 0.5 N이 되게 하였다. Perchloric acid를 처리한 침전물과 상층액은 90에서 15분간 끓인 후 1,500 \times g에서 10분간 원심분리하여 단백질과 세포의 부스러기를 제거하고 상층액은 diphenylamine (DPA) 혼합액(1.5 g의 DPA + 1 ml의 H₂SO₄ + 100 ml의 glacial acetic acid + 50 mM CH₃CHO)를 첨가하여 상온에서 16~20 시간 동안 방치한 후 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 조절군 (control)의 DNA fragmentation [(fragmented DNA)/(fragmented DNA + intact DNA)]은 전체 DNA 함량 중 상층액의 DNA양을 %로 표현하였으며 시료처리의 효과는 조절군의 DNA fragmentation의 %로 나타내었다.

TUNEL assay - FRTL 세포의 apoptosis를 apoptosis detection kit로 측정하였다. 즉, 세포를 glass coverslips에서 24시간 배양한 후 cytokine [IFN- γ (100 U/ml)와 TNF- α (0.5 ng/ml)]과 감궁탕(0, 0.3, 1.5, 3.0과 9.0 mg/ml)을 포함한 배지에서 48시간 배양하였다. 그 후 세포가 자란 coverslips을 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하고 3.7% formaldehyde로 고정시키고, cytonin 처리에 의하여 세포막의 투과성을 증가시켰다. Biotin화 된 뉴클레오티드는 Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT)에 의하여 절편화된 DNA에 결합되고, 이 뉴클레오티드는 diaminobenzidine (DAB)에 의하여 streptavidine-horseradish peroxidase conjugate로 추적되었다. 이러한 효소반응에 의하여 DNA fragmentation

부위에는 불용성의 색깔을 가진 침전물이 형성되었다. Apoptosis 세포의 비율은 현미경 아래 10~20 부위를 임의로 정하고, 주어진 부위에서 전체 세포 중 TUNEL-positive 한 세포수의 비율로 계산하였다.

통계학적 처리 - 실험결과는 평균 ± 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's t-test를 수행하여 결과치는 p 값이 0.05 미만을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

FRTL 세포주의 생존력 - 사이토카인 처리에 의한 FRTL 의 apoptosis 유도를 세포의 생존력으로 측정된 결과, FRTL 세포주(1×10^4)에 0~500 U/ml의 IFN- γ 를 처리하고 48시간 후에 세포에 미치는 영향을 살펴본 결과, IFN- γ 은 갑상선세

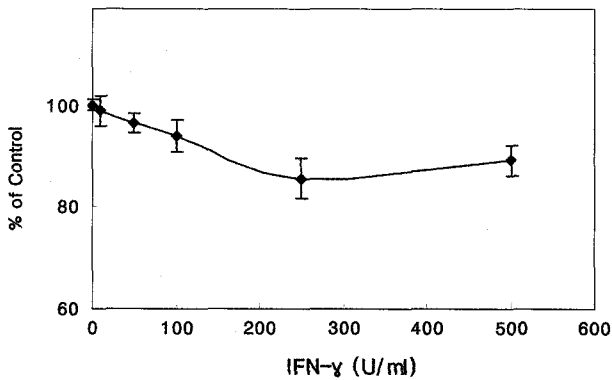


Fig. 1. Effect of IFN- γ on survival of FRTL cells. Cells were incubated for 48 h with recombinant rat IFN- γ . The values are expressed as the mean \pm SD of three experiments.

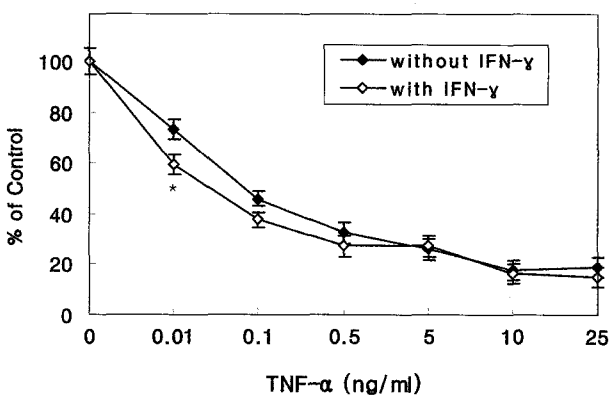


Fig. 2. Effect of TNF- α alone or in combination with IFN- γ (100 U/ml) on survival of FRTL cells. Cells were incubated for 24 h with recombinant rat TNF- α alone (solid symbol) or in combination with IFN- γ (open symbol). The values are expressed as the mean \pm SD of three experiments. *p < 0.05 compared with no combined culture.

포의 생존력에 영향이 없었다(Fig. 1). 그러나 TNF- α (0~25 ng/ml)를 FRTL 갑상선세포에 처리하였을 때 TNF- α 의 농도의존적으로 세포독성이 증가하였다(Fig. 2). 또한 갑상선 세포에 IFN- γ (100 U/ml)과 TNF- α (0~25 ng/ml)를 동시에 처리하면 TNF- α 만 처리하였을 때 보다 세포독성효과가 증가하였다(Fig. 2). 사이토카인에 의해 유도된 세포독성에 감공탕이 미치는 영향을 측정된 결과, IFN- γ (100 U/ml)과 TNF- α (0.5 ng/ml) 처리 후 감공탕 0.3, 1.5, 3.0과 9.0 mg/ml의 처리에 의하여 세포의 cytotoxicity를 각각 13, 26, 31과 42% 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

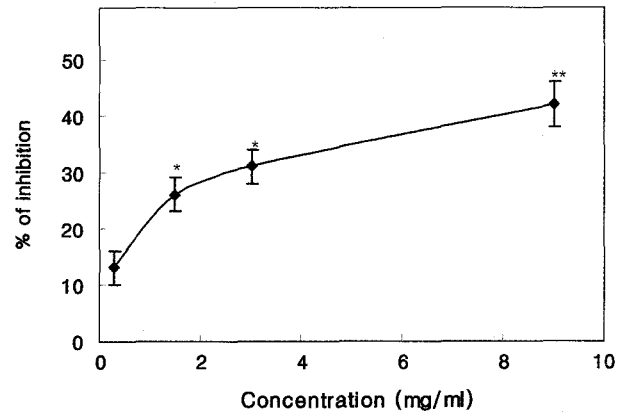


Fig. 3. Effect of Gamgung-tang (GGT) on IFN- γ (100 U/ml) and TNF- α (0.5 ng/ml)-induced cytotoxicity of FRTL cells. Gamgung-tang (GGT) was included in the thyroid cell cultures during the 72 h incubation with IFN- γ and TNF- α (preincubation with 100 U/ml IFN- γ for 48 h and subsequent 0.5 ng/ml TNF- α for 24 h). Cytotoxicity was estimated by MTT assay. % Inhibition = [cytotoxicity of control - cytotoxicity with sample treatment/cytotoxicity of control] \times 100%. The values are expressed as the mean \pm SD of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with control.

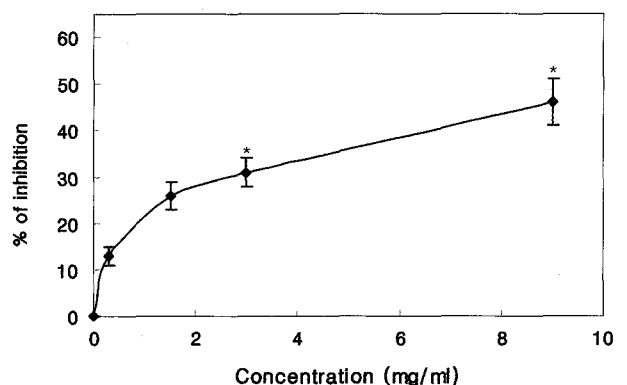


Fig. 4. Effect of Gamgung-tang (GGT) on IFN- γ and TNF- α -induced DNA fragmentation in FRTL cells. The values are expressed as the mean \pm SD of three experiments. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with control.

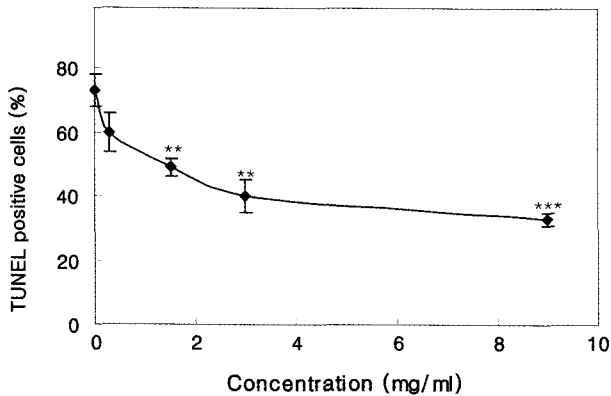


Fig. 5. Effect of Gungtang (GGT) on apoptosis in response to IFN- γ and TNF- α in FRTL cells. Apoptosis was measured by TUNEL assay. The values are expressed as the mean \pm SD of three experiments.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ compared with control.

DNA fragmentation – 사이토카인에 의한 DNA fragmentation을 정량분석으로 실험한 결과, cytokine (100 U/ml의 IFN- γ 과 0.5 ng/ml의 TNF- α)의 처리에 의하여 62%의 DNA fragmentation 현상이 나타났으며 감궁탕 0.3, 1.5, 3.0과 9.0 mg/ml의 처리에 의하여 약 13~46%의 저해효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

TUNEL assay – 세포의 apoptosis를 TUNEL법으로 확인 하였을때, cytokine (100 U/ml의 IFN- γ 과 0.5 ng/ml의 TNF- α)에 의하여 세포의 DNA fragmentation을 관찰할 수 있었으며, 감궁탕 0.3, 1.5, 3.0과 9.0 mg/ml의 처리에 의하여 각각 18, 33, 45와 55% 저해효과를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

하시모토갑상선염에서 갑상선세포의 파괴와 갑상선기능 저하증은 높은 CD8⁺ T 세포의 침투와 관련이 있으며, 활성화된 T 세포가 T_H1 표현형을 나타내며 IFN- γ 을 생성한다.¹⁰⁾ IL-10은 IFN- γ 합성을 저해하는 T_H2 사이토카인으로 알려져 있고,¹¹⁾ CD8⁺ T 세포를 위한 chemoattractant 인자로서 CD4⁺ T 림프세포의 이동을 방해한다.¹²⁾ 유전적으로 실험적 자가면역갑상선염 (experimental autoimmune thyroiditis, EAT)에 민감한 CBA/J 생쥐에 thyroglobulin (Tg)을 면역하여 EAT 유발시, 사람의 IL-10을 주사하면 EAT의 증상을 약화시키는 것이 보고되었다.¹³⁾ 또한 감초 (50 μ g/ml)가 peripheral blood mononuclear 세포에서 감초를 처리하지 않은 세포보다 약 9배의 IL-10의 생성을 유도하였으며,¹⁴⁾ Mikamo 등¹⁵⁾은 쥐에서 감초와 당귀가 TNF- α 를 감소시킴을 증명하였다. 본 논문의 실험에 사용한 생약혼합물 (감초, 흑두, 당귀, 천궁)이 사이토카인(IFN- γ 와 TNF- α)에 의해 유도된 갑상선세포의 독성을 저해하였다. 그러므로 본 논문실험에서

는 생약혼합물에 의한 IL-10의 생성을 직접적으로 측정하지는 않았지만, 아마도 생약혼합물이 IL-10의 생성을 유도하고, 증가한 IL-10에 의해 IFN- γ 과 TNF- α 의 생성이 저해되어, 갑상선염에서 갑상선세포가 파괴되는 것을 억제할 가능성이 있을 것으로 보인다.

Apoptosis (프로그래밍 세포사)는 조직의 항상성, 비정상적인 세포성장조절과 면역계 조절의 유지를 위해 중요한 현상으로,¹⁶⁾ necrosis와 다른 세포사멸 현상으로 핵응축, membrane blebbing, DNA 단편화현상등의 형태적 특징을 나타낸다.¹⁷⁾ 갑상선에서는 apoptosis가 정상적인 갑상선 크기의 조절에 관여하고 자가면역 갑상선질환에서의 갑상선 세포 파괴의 주요한 현상의 하나로 알려져 있다.¹⁸⁾ 특히 하시모토갑상선염에서는 갑상선세포에 반응하는 림프세포의 축적이 갑상선의 파괴를 가져오며 갑상선 조직의 면역조직학적 염색에 의하면 갑상선세포 사멸의 한 기전이 apoptosis로 증명되었다.¹⁸⁾ 하시모토갑상선염에서는 IFN- γ 과 TNF- α 의 분비가 증가됨이 보고되었으므로,^{4,6)} 본 논문의 실험에서는 IFN- γ 과 TNF- α 를 갑상선세포에 처리하여 세포의 apoptosis 증가현상을 확인하였다. 그리고 증가한 apoptosis가 감궁탕에 의해 억제됨을 증명하였다. 그러나 아직 갑상선 세포에서의 apoptosis 작용기전이 자세히 알려져 있지 않았으므로 그 기전을 apoptosis 관련 분자들에 대한 분자생물학적 분석에 대한 실험으로 그 기전을 증명할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

생약혼합물인 감궁탕이 사이토카인 (IFN- γ 과 TNF- α)에 의한 흰쥐 갑상선세포(FRTL)의 apoptosis 유도에 미치는 영향을 살펴본 결과, 감궁탕이 IFN- γ (100 U/ml)과 TNF- α (0.5 ng/ml)에 의한 세포의 cytotoxicity를 억제하였다. 감궁탕추출물 처리에 의해 사이토카인으로 유도한 DNA fragmentation을 억제하였으므로 감궁탕은 갑상선염에서 갑상선 세포가 파괴되는 것을 저해할 것으로 보인다.

사 사

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원 (01-PJ9-PG1-01CO04-0002)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Kloos, R. T. and Baker Jr., J. R. (1996) Thyroiditis, *In* Robert, E. R. (ed.), *Conn's Current Therapy*, 634-641. WB Saunders Company, Philadelphia.

2. Arsiccott, P. L., Knapp, J., Rymaszewski, M., Bartron, J. L., Bretz, J. D., Thompson, N. W., and Baker Jr., J. R. (1997) Fas (APO-1, CD95)-mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. *Endocrinology* **138**: 5019-5027.
3. Giordano, C., Stassi, G., De-Maria, R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R., and Galluzzo, A. (1997) Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* **137**: 3163-3169.
4. Del Prete, G. F., Tiri, A., Mariotti, S., Pinchera, A., Ricci, M., and Romagnani, S. (1987) Enhanced production of gamma-interferon by thyroid-derived T cell clones from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Clin. Exp. Immunol.* **69**: 323-331.
5. Del Prete, G. F., Tiri, A., De Carli, M., Mariotti, S., Pinchera, A., Chretien, I., Romagnani, S., and Ricci, M. (1989) High potential to tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production of thyroid infiltrating T lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis: a peculiar feature of destructive thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* **4**: 267-276.
6. Turner, M., Londei, M., and Feldmann, M. (1987) Human T cells from autoimmune and normal individuals can produce tumor necrosis factor. *Eur. J. Immunol.* **17**: 1807-1814.
7. 최호승, 김영목, 임종국, 손윤희, 남경수, 김철호, 전병훈 (2003) 감궁탕 가미방이 감삼샘 기능장애에 미치는 효과. *동의생리병리학회지* **17**: 648-655.
8. 남경수, 손윤희, 백태선, 김철호, 임종국, 황철원 (2002) Anti-thyroglobulin monoclonal antibody의 제작 및 특성. *한국생명과학회지* **12**: 460-463.
9. Shon, Y. H., Lee, H. S., Lim, J. K., Kim, C. H., Jeon, B. H., and Nam, K. S. (2004) Effect of herbal medicines on cytokine-induced cytotoxicity and MHC class antigen expression in rat thyroid cells. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 371-374.
10. Roura-Mir, C., Catalfamo, M., Sospedra, M., Alcalde, L., Pujol-Borrell, R., and Jaraquemada, D. (1997) Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3290-3302.
11. Stohlman, S. A., Pei, L., Cua, D. J., Li, Z., and Hinton, D. R. (1999) Activation of regulatory cells suppresses experimental allergic encephalomyelitis via secretion of IL-10. *J. Immunol.* **163**: 6338-6344.
12. Romagnani, S. (1997) The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* **18**: 263-266.
13. Mignon-Godefroy, K., Rott, O., Brazillet, M. P., and Charreire, J. (1995) Curative and protective effects of IL-10 in experimental autoimmune thyroiditis (EAT). Evidence for IL-10-enhanced cell death in EAT. *J. Immunol.* **154**: 6634-6643.
14. Yamashiki, M., Nishimura, A., and Kosaka, Y. (1995) Effects of Sho-saiko-to for in vitro cytokine production on peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral liver diseases. *Hepatol. Res.* **3**: S127.
15. Mikamo, H., Kawazoe, K., Sato, Y., Hayasaki, Y., Izumi, K., and Tamaya, T. (1999) Effects of crude herbal ingredients on serum levels of inflammatory cytokines in a rat uterine endometritis model. *Curr. Ther. Res.* **60**: 105-110.
16. Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462.
17. Wylie, A. H., Kerr, J. F. R., and Currie, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
18. Kotani, T., Aratake, Y., Hirai, K., Fukazawa, Y., Sata, H., and Ohtaki, S. (1995) Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* **20**: 231-236.

(2005년 3월 3일 접수)