

감공탕이 사람의 갑상선세포에서 Fas 매개성 apoptosis에 미치는 영향

남경수 · 손옥례 · 김미경 · 김철호¹ · 소명숙² · 전병훈³ · 손윤희*

동국대학교 난치병한양방치료연구소 및 의과대학 약리학교실, 1: 동국대학교 한의과대학 생화학분자생물학교실, 2: 대구보건대학 간호학과, 3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of Gamgung-tang on Fas-mediated Apoptosis in Human Thyrocytes

Kyung Soo Nam, Ok Lye Son, Mee Kyung Kim, Cheorl Ho Kim¹, Myung Suk So², Byung Hun Jeon³, Yun Hee Shon*

Intractable Disease Research Center and Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University, 1: Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, 2: Department of Nursing, Daegu Health College, 3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Inflammatory cytokine, abundantly produced in Hashimoto's thyroiditis, induced Fas expression in normal thyrocytes. We determined that susceptibility to Fas-activated apoptosis could be influenced by inflammatory cytokine and investigated a potential role of Gamgung-tang (GGT, Glycyrrhizae Radix, black beans, Angelicae Radix and Cnidii Rhizoma) in the thyroid follicular cells. IL-1β was able to induce Fas expression in normal thyrocytes. GGT inhibited IL-1β-induced Fas expression. Thyroid follicular cells were found to undergo DNA fragmentation with the inflammatory cytokines. GGT inhibited DNA fragmentation in a dose-dependent manner. These results suggest that GGT inhibit Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells, therefore, may have therapeutic potential in the treatment of autoimmune chronic thyroiditis.

Key words : thyroiditis, apoptosis, Fas, cytokine, DNA fragmentation

서 론

하시모토갑상선염 (Hashimoto's thyroiditis)은 림프성 침윤 (lymphocytic infiltration)과 섬유증 (diffuse fibrosis)에 의한 갑상선세포의 손실에 의해 나타나는 만성 자가면역질환이다¹⁾. 하시모토갑상선염에서 thyroid reactive lymphocytes의 축적은 갑상선 조직의 파괴를 일으키는데 갑상선세포 파괴의 주요기전이 세포의 apoptosis인 것으로 알려져 있다²⁾. Apoptosis는 세포막의 death receptor에 ligand가 결합하여 일으키거나, trophic signal의 손실에 의해 일어난다. Apoptosis에는 death receptor, adaptor molecule, caspase cascade, mitochondria와 Bcl-2 등이 관여한다. 이러한

apoptosis를 유도하는 death receptor 중 가장 잘 알려진 것 중의 하나가 Fas이다³⁾. Fas는 45 kDa의 세포막단백질로 tumor necrosis factor (TNF) 수용체군 (receptor family)에 속하고 Fas ligand에 의한 Fas의 활성화는 세포의 apoptosis를 일으키는 세포내 신호의 시작이다⁴⁾. 이 경로의 조절은 경로과정에서 다양하게 일어날 수 있으며, Fas와 Fas ligand의 발현 정도도 이 과정에서 변화될 수 있다⁵⁾.

감공탕 (Gamgung-tang, GGT)은 감초, 흑두, 당귀 및 천궁으로 구성된 복방으로 감공탕 가미방이 갑상선 기능장애에 효능이 있음이 보고되었으며⁶⁾, 감공탕과 갑상선기능저하증의 자가항체와의 상관성에 관한 연구도 보고되었다⁷⁾. 본 논문에서는 사람의 갑상선조직에서 갑상선세포를 분리하여 이 세포에서 염증성 사이토카인 중 하나인 Interleukin-1β (IL-1β)에 의해 Fas 발현의 유도를 확인하고 감공탕이 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 IL-1β에 의한 사람 갑상선세포의 DNA fragmentation을 측정하고 감공탕이

* 교신저자 : 손윤희, 경북 경주시 석장동707 동국대 난치병한양방치료연구소

· E-mail : yhshon@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2633

· 접수 : 2005/05/27 · 수정 : 2005/06/28 · 채택 : 2005/07/29

IL-1β에 의한 DNA fragmentation에 미치는 영향을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 시약

RPMI 1640 medium, Hank's balanced salt solution (HBSS), collagenase, bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent, bovine serum albumin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, dispase는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), Fas antibody는 StressGen (Victoria, BC, Canada), IL-1β는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA), secondary antibody는 ZYMED (San Francisco, USA)에서 구입하였으며 기타 시약은 세포배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 감공탕 제조

감공탕 재료 (감초 15 g, 흑두 15 g, 당귀 15 g, 천궁 15 g) 60 g에 3차 증류수 400 ml를 가한 뒤 rotary evaporator (BÜCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 4°C, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 200 ml이 되도록 감압농축하고 ethanol을 가하여 75%, 85%, 95% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μm, Whatman, Germany)로 여과하여 여액을 pH 7.4로 조절하였다. 여과된 시료는 동결건조기를 이용하여 완전건조시킨 후 건조중량 (30 mg/ml)을 측정하였다. 그리고 실험 조건에 사용되는 배지 및 증류수에 희석하여 실험에 사용하였다.

3. 갑상선세포 배양

갑상선암 환자로부터 정상적인 갑상선조직을 얻었다. 갑상선조직은 HBSS에 씻은 후 연결조직들을 제거하고 다시 씻어 주었다. 갑상선조직을 잘게 자른 다음, 100 μg/ml collagenase와 3.33 mg/ml dispase가 포함된 HBSS에 넣고 37°C에서 15분씩 2번 반복하여 효소분해하였다. 이 부유액을 여과하고 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 20 mM HEPES buffer와 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)을 포함한 RPMI 1640 배지를 섞어준 다음 900 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 ammonium chloride lysis buffer (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KPO₄ and 1mM EDTA, pH 7.3)로 적혈구를 용해시키고 갑상선세포는 20% heat-inactivated FBS를 포함한 RPMI 1640 배지를 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였으며, 비부착성 세포를 제거하기 위해서 매일 RPMI 1640 배지로 세척하였다.

4. 단백질 추출과 Fas 발현 측정 (Western blotting)

갑상선세포 (3×10⁵ cells/well)를 6-well plate에 깔고 24시간 배양한 후 IL-1β (100 U/ml)과 감공탕을 농도별로 처리한 다음 72시간에 차가운 PBS buffer를 사용하여 2~3회 세척한 후, 50 μl lysis buffer (10 mM CHAPS, 2 mM EDTA, 4 mM iodoacetate, 단백질 억제제가 포함된 PBS)로 얼음에서 30분간 용해시킨 다음,

12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 단백질 함량은 BCA assay로 정량하였으며 25 μg의 단백질을 12.5% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후 10% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 polyvinylidene difluoride막으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 실온에서 5% non-fat dry milk 용액으로 비특이적 반응을 차단하였고, 차단용 완충액으로 희석한 Fas에 대한 1차 항체용액에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 tris-tween buffered saline (TTBS)을 사용하여 5분 간격으로 3회 세척하였다. 계속해서 biotin 이 부착된 2차 항체에서 2시간 반응시키고 TTBS로 5분 간격으로 3회 세척하였다. 그리고 alkaline phosphatase (AP) streptavidine 을 1시간 동안 반응시키고 AP buffer로 5분 간격으로 3회 세척하였다. 세척이 끝난 후 막을 AP buffer와 혼합한 4-nitro blue tetrazolium chloride와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphate를 사용하여 밴드를 확인하였고, 증류수로 여러 차례 세척하고 막을 건조시킨 다음 밴드의 두께를 비교하여 Fas의 발현 차이를 확인하였다.

5. DNA fragmentation

갑상선세포 (3×10⁵ cells/well)를 6-well plate에 접종시키고 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 18시간 경과 후 배지를 교환하여 100 U/ml IL-1β와 농도별 (0, 0.3, 1.5, 3.0과 9.0 mg/ml) 감공탕을 처리하여 72시간 배양한 후, 세포에서의 DNA 절편화현상을 분광광도기를 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 처리한 세포를 회수한 후 차가운 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8.0)에서 분쇄하였다. Homogenates는 침전물의 chromatin과 상층액의 fragmented DNA를 분리하기 위하여 27,000 ×g에서 20분간 원심분리하였다. 침전물은 0.5 N perchloric acid로 부유시키고 상층액은 높은 농도의 perchloric acid를 첨가하여 0.5 N이 되게 하였다. 90°C에서 15분간 끓인 후 1,500 ×g에서 10분간 원심분리하여 단백질과 세포의 부스러기를 제거하고 상층액은 diphenylamine (DPA) 혼합액 (1.5 g DPA + 1 ml H₂SO₄ + 100 ml glacial acetic acid + 50 mM CH₃CHO)를 첨가하여 상온에서 16~20 시간 동안 방치한 후 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 조절군의 DNA fragmentation [(fragmented DNA)/(fragmented DNA + intact DNA)]은 전체 DNA 함량 중 상층액의 DNA양을 %로 표현하였으며 시료처리의 효과는 조절군의 DNA fragmentation의 %로 나타내었다.

6. 통계학적 처리

실험결과는 평균±표준편차 (mean±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

1. 사이토카인에 의한 Fas의 발현

사람의 정상 갑상선세포에 염증성 사이토카인 IL-1β를 100, 200 U/ml 농도로 각각 처리하여 Fas 단백질 발현을 관찰하였다.

100 U/ml과 200 U/ml의 IL-1 β 에서 Fas의 발현 정도에서는 큰 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 1).

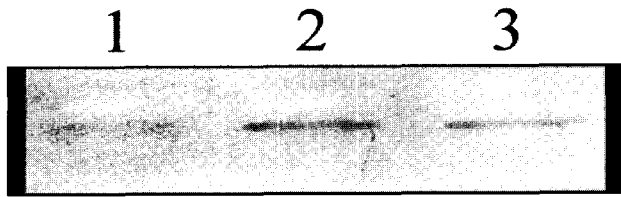


Fig. 1. Fas expression in thyrocytes in response to IL-1 β treatment. Lane 1, no treatment; Lane 2, 100 U/ml IL-1 β ; Lane 3, 200 U/ml IL-1 β . This experiment is representative of results from three independent experiments each using thyrocytes culture derived from different patient samples.

2. Fas의 발현 억제효과

정상 갑상선세포에 100 U/ml 농도의 IL-1 β 와 감공탕을 농도별(0, 0.3, 1.5, 3.0, 9.0 mg/ml)로 처리하여 72시간 반응시킨 후 Fas의 발현 정도를 관찰한 결과, 100 U/ml의 IL-1 β 만 처리한 경우보다 감공탕을 농도별로 처리했을 경우에 Fas의 발현이 억제되었으며 감공탕의 농도가 증가할수록 Fas의 발현도 억제되었다. 특히, 감공탕 9.0 mg/ml에서는 Fas의 발현을 거의 관찰할 수 없었다 (Fig. 2).

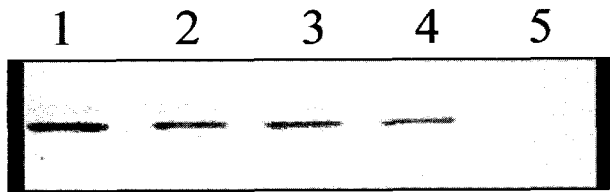


Fig. 2. Effect of Gamgung-tang (GGT) on IL-1 β -induced Fas expression in thyrocytes. Lane 1, 100 U/ml IL-1 β ; Lane 2, 100 U/ml IL-1 β and 0.3 mg/ml GGT; Lane 3, 100 U/ml IL-1 β and 1.5 mg/ml GGT; Lane 4, 100 U/ml IL-1 β and 3.0 mg/ml GGT; Lane 5, 100 U/ml IL-1 β and 9.0 mg/ml GGT. This experiment is representative of results from three independent experiments each using thyrocytes culture derived from different patient samples.

3. DNA fragmentation의 저해효과

IL-1 β (100 U/ml)에 의하여 유도되는 DNA fragmentation의 저해에 감공탕이 미치는 영향을 알아보기 위해 정상 갑상선세포에 IL-1 β (100 U/ml)와 감공탕을 농도별(0, 0.3, 1.5, 3.0, 9.0 mg/ml)로 처리하여 72시간 반응시킨 후 DNA fragmentation의 저해 효과를 측정해 본 결과, 감공탕의 농도가 증가할수록 DNA fragmentation의 저해율이 증가하는 경향을 나타내었으며 감공탕 3.0 mg/ml ($p < 0.05$)과 9.0 mg/ml ($p < 0.01$) 농도에서 통계적으로 유의성 있는 저해효과를 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Effect of GGT on IL-1 β -induced DNA fragmentation in thyrocytes

Concentration (mg/ml)	Inhibition (%)
0.3	9 \pm 2
1.5	19 \pm 2
3.0	31 \pm 3*
9.0	43 \pm 5**

The values are expressed as the mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

고 찰

Apoptosis는 다세포생물체에서 세포의 성장과 항상성을 유지하기 위한 필수적이고 중요한 기전⁸⁾으로서 apoptosis를 유발시키는 여러 가지 신호전달체계 기전 중에서 세포막 수용체와 연관된 기전이 주요한 신호전달체계로 알려져 있다⁹⁾. Fas (Apo-1, CD95, FasR)는 tumor necrosis factor receptor 계열에 속하는 것으로서 death domain을 갖고 있는 45 kDa의 type I 세포막 단백질이며 세포사에 핵심적인 역할을 하고 있어 많은 면역질환과 종양의 병리기전에 관여하고 있다¹⁰⁾. Fas는 세포막 외부에 있는 cystein-rich domain (CRD)에 Fas ligand (FasL)나 anti-Fas 항체가 결합하여 활성화되면 apoptosis 신호가 adaptor 물질인 Fas-associated death domain (FADD)을 통해 여러 cysteinyl-aspartate-specific protease (caspase)들을 활성화시켜 apoptosis를 유발하고 있다. Fas는 활성화 T-세포, 흥선, 간, 심장, 신장 등의 정상 임파조직이나 비임파조직과 신경교종, 위암, 유방암, 전립선암, 갑상선선종 등의 여러 종양조직이나 세포주에서 많이 발현된다¹¹⁾.

갑상선에서는 apoptosis가 정상적인 갑상선 크기의 조절에 관여하고 자가면역성갑상선질환에서의 갑상선세포 파괴의 주요한 현상의 하나로 알려져 있다¹²⁾. 최근에는 자가면역질환의 표적 세포에서 Fas/FasL계의 역할과 이에 관여하는 여러 가지 물질들의 관계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, Giordano 등¹³⁾은 자가면역성 갑상선질환의 대표적인 하시모토갑상선염에서도 Fas 및 FasL가 관여함을 보고하였다. 또한 이런 연구들에 의하여 apoptosis와 관련물질들을 조절하는 유전자의 이상이 갑상선암의 발생에 중요한 인자가 된다고 알려져 있다¹⁴⁾.

따라서 본 연구에서는 감공탕이 염증성 사이토카인 중 하나인 IL-1 β 에 의해 유도된 apoptosis에 미치는 영향을 조사해 보았다. 그 결과, 감공탕이 IL-1 β 의 처리에 의하여 발현되는 Fas를 억제시켰으며 감공탕의 농도가 증가할수록 Fas의 발현도 억제되었다. 또한 IL-1 β 에 의하여 유도되는 DNA fragmentation이 감공탕의 농도가 증가할수록 DNA fragmentation의 저해율이 증가하는 경향을 나타내었다. 그러므로 감공탕이 갑상선세포에서 apoptosis의 증가현상에 밀접한 관련이 있는 Fas의 발현을 억제하고 DNA fragmentation을 저해함으로써 만성자가면역성갑상선염의 치료에 도움이 될 것으로 기대된다.

결 론

사람의 갑상선조직에서 분리한 정상 갑상선세포에서 염증성 사이토카인 IL-1 β 에 의한 Fas 발현의 유도를 확인하고 감공탕이 Fas 발현과 DNA fragmentation에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 IL-1 β 는 정상 갑상선세포에서 Fas의 발현을 유도하였고 감공탕은 IL-1 β 에 의해 유도된 Fas의 발현을 억제하였다. 또한 감공탕은 IL-1 β 에 의한 DNA fragmentation을 농도 의존적으로 억제하였다. 따라서 감공탕은 갑상선세포에서 염증성 사이토카인에 의해 유도된 Fas 단백질 발현과 DNA fragmentation의 억

제 효과에 의해 만성자가면역성갑상선염의 치료에 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. Stassi, G., Zeuner, A., Di Liberto, D., Todaro, M., Ricci-Vitiani, L., De Maria, R. Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Clinical Immunology* 21, 19-23, 2001.
2. Arscott, P.L., Knapp, J., Rymaszewski, M., Bartron, J.L., Bretz, J.D., Thompson, N.W., Baker, Jr, J.R. Fas (APO-1, CD95)-mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. *Endocrinology* 138, 5019-5027, 1997.
3. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449, 1995.
4. Bretz, J.D., Arscott, P.L., Myc, A., Baker Jr, J.R. Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 25433-25438, 1999.
5. Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F., Green, D.R. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444, 1995.
6. 최호승, 김영목, 임종국, 손윤희, 남경수, 김철호, 전병훈. 갑공탕 가미방이 갑상샘 기능장애에 미치는 효과. *동의생리병리학회지* 17, 648-655, 2003.
7. 남경수, 손윤희, 백태선, 김철호, 임종국, 황철원. Anti-thyroglobulin monoclonal antibody의 제작 및 특성. *한국생명과학회지* 12, 460-463, 2002.
8. Vaux, D.L., Strasser, A. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2239-2244, 1996.
9. Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M. A cell killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down-regulated with the receptor of tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine* 169, 1747-1756, 1989.
10. Krammer, P.H. CA95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795, 2000.
11. Pernick, N.L., Biernat, L., Du, W., Visscher, D.W. Clinicopathologic analysis of Fas, Fas ligand and other biomarkers in locally advanced breast cancer. *The Breast Journal* 6, 233-241, 2000.
12. Kotani, T., Aratake, Y., Hirai, K., Fukazawa, Y., Sato, H., Ohtaki, S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 20, 231-236, 1995.
13. Giordano, C., Stassi, G., De Maria, R., Todaro, M., Richiusa, P., Papoff, G., Ruberti, G., Bagnasco, M., Testi, R., Galluzzo, A. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275, 960-963, 1997.
14. An, I.M. The molecular biologic mechanisms of the development of the thyroid cancer. *The 18th spring congress of the Korean Society of Endocrinology* 31-39, 2000.