

원 저

茵陳四苓散 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-Mediated Apoptosis에 미치는 영향

고 흥, 이장훈¹⁾, 우홍정¹⁾

세명대학교 한의과대학 간계내과학교실, 경희대학교 한의과대학 간계내과학교실¹⁾

The Effects of 5 kinds of *Injinsaryung-San* fractions on Cell Viability, Cell Cycle Progression and Fas-mediated Apoptosis of HepG2 Cells

Heung Ko, Jang-Hoon Lee¹⁾, Hong-Jung Woo¹⁾

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University,
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University¹⁾

Objectives : This study was carried out to evaluate the effects of five fractions on cell viability, cell cycle progression and apoptosis.

Methods : This study employed MTT assay, Cell cycle analysis, Cpp32 protease assay, DNA fragmentation assay and Quantitative RT-PCR analysis.

Results : In MTT assay, the butanol fraction of *Injinsaryung-San* has showed magnificent viability, while the H₂O fraction and ethylacetate fraction also showed higher viability than the control group. The H₂O fraction of *Injinsaryung-San* has showed magnificent viability, and butanol fraction and ethylacetate fraction of *Injinsaryung-San* with etoposide have also showed higher viability than the only etoposide group. Cell cycle analysis showed that each fraction of *Injinsaryung-San* had no significant effect on the cell cycle. DNA fragmentation assay showed that the butanol fraction, H₂O fraction and ethylacetate fraction carried inhibitory effects on apoptosis induction. Cpp32 protease activity assay showed that the butanol fraction, H₂O fraction and ethylacetate fraction decreased Cpp32 protease activity, with the butanol fraction displaying greater effects. Quantitative RT-PCR showed that the butanol fraction, H₂O fraction and ethylacetate fraction suppressed Fas and Bax genes, the butanol fraction increased Bcl-2 gene, however no effect on Cpp32.

Conclusions : The data shows that the butanol fraction of *Injinsaryung-San* increases the hepatocyte viability and has the heptocellular protective effect by the suppression of apoptosis through gene regulation. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(3):174-185)

Key Words: Five fractions of *Injinsaryung-San*, Butanol fraction, Apoptosis, Fas, Bcl-2, Bax

서 론

· 접수 : 2000년 9월 25일 · 수정 : 10월 23일 · 채택 : 10월 24일
· 교신저자 : 고 흥, 충북 제천시 신월동 산21-11 세명대부속
병원 간계내과
(Tel. 033-649-1813)

우리나라에서 간질환의 대부분은 바이러스성 간염이다. 급성 바이러스성 간염의 60%, 만성 간질환 및

간암환자의 60~70%가 HBsAg 양성이며, 만성 간염, 간경변증, 간암 환자의 anti-HCV 발현빈도는 각각 27%, 20%, 17%로 나타난다¹⁻³⁾. 또한 40~50대의 사망 원인중 각종 간질환이 1, 2위를 차지하고 있고 간암으로 인한 사망율은 세계보건통계연감에 발표된 나라중 가장 높은 것으로 나타났다⁴⁾. 따라서 현재 만연하고 있는 바이러스성 간질환에 대한 예방과 치료는 시급히 해결해야 할 사회적인 문제이다.

바이러스에 의한 세포손상은 바이러스의 직접적인 손상보다는 바이러스에 감염되었을 때 발생하는 면역응답의 결과가 주요기전으로 알려져 있다⁵⁾. 특히 HBV에 감염된 간세포에서 세포성 면역반응은 T helper cell에 의해 항원이 인식되고 cytotoxic T cell에 의한 간세포 괴사로 종결되는 면역반응으로 HBV에 감염된 간세포를 파괴하여 간염을 유발함과 동시에 HBV를 제거하는 단계이다^{3,6)}. 그리고 이와 같은 감염 세포의 제거기전은 아직까지 명확하지는 않으나 최근 cytotoxic T cell이 유도하는 소위 Fas-mediated apoptosis가 제시되고 있다^{7,9)}.

Apoptosis는 1972년 Kerr¹⁰⁾ 등에 의하여 정립되었는데 암, 바이러스성 질환, AIDS 등 여러 가지 질병의 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 간질환에서도 간세포 증식, 재생, 간비대, 간위축 및 간암의 병리과정에 관계하고 있는 것으로 알려져 있다^{9,11)}. 특히 B형 및 C형 바이러스성 간염에서 acidophilic body, piecemeal necrosis 부위의 병변의 정도는 Fas를 매개로 하는 apoptosis와 서로 부합된다^{9,11)}. 실험적으로는 Fas antibody를 복강으로 주입하는 경우 전격성 간염이 발생하며¹²⁾, HBsAg을 이용하여 만든 transgenic mice model에서 CTL(cytotoxic T lymphocyte)반응을 촉진하는 경우 전격성 간염이 발생하였다¹³⁾. 따라서 Fas를 매개로 하는 apoptosis는 바이러스성 간염의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하고 있다.

茵陳四苓散은 張仲景^{14,15)}이 濕熱黃疸의 치료를 목적으로 사용한茵陳五苓散에서 肉桂를 除한 처방으로 현재 임상에서 만성 간질환 치료에 기본방으로 사용되고 있다^{16,17)}. 현재까지茵陳四苓散 및茵陳四

苓散加減方에 대한 연구로는 간세포보호, 이담작용, 지질강하, 바이러스 억제, 항암작용 및 약물 안정성에 관해 보고하였다¹⁸⁻²²⁾.

최근에는 한약의 간보호 효과에 대한 면역학적·분자생물학적 접근이 시도되고 있는데, 특히 apoptosis와 연관된 간세포 보호기전에 중점을 두어茵陳四苓散 또는茵陳四苓散加減方이 apoptosis를 억제하여 간세포를 보호하는 것을 보고해 왔으나 주요 약효부위에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다.

이에 저자는茵陳四苓散을 분획하고 HepG2 cell을 이용하여 MTT assay로 간세포 활성도를 측정하고 Cell cycle analysis를 통해 세포주기를 관찰하였으며, Fas-antibody로 유발된 HepG2 cell의 apoptosis 억제 정도를 알아보기 위하여 DNA fragmentation assay를 시행하고, Fas-mediated apoptosis와 관련된 유전자 발현의 변화를 파악하기 위하여 Quantitative RT-PCR을 시행하여茵陳四苓散중 apoptosis 억제를 통한 간세포보호작용이 뚜렷한 분획부위를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

2분 실험에 사용한 약재는 한약규격집^{23,24)}에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료 665g을 3차 증류수 4.8 L로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1. Alpha/4, Germany)를 이용하여 70.6g의 건조 추출물을 얻었으며 수율은 10.53%이었다.

Prescription of *Injinsaryung-San*(*Yinchensiling-san*)

Pharmacognosy Name(Herbs)	Scientific Name	Dose
<i>Artemisiae Capillaris Herba</i> (茵陳)	<i>Artemisiae Capillaris</i> THUNB	45g
<i>Artractylodis Rhizoma Alba</i> (白朮)	<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ	12g
<i>Polyporus</i> (猪苓)	<i>Polyporus umbellatus</i> FRIES	12g
<i>Hoelen</i> (茯苓)	<i>Poria cocos</i> WOLF	12g
<i>Alismatis Rhizoma</i> (澤瀉)	<i>Alisma plantago-aquatica var. orientale</i> SAMUELS	8g
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISXH	6g
Total		95g

2. 방법

1) 유기용매를 이용한 茵陳四苓散 분획

위에서 얻은 茵陳四苓散 중 30g을 이용하여, 1차 추출용매인 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, H₂O의 5가지 용매에 녹였다. 방법은 다음과 같다. 우선 sample 30g을 증류수 300ml에 녹인다. 그 후 hexane 200ml를 넣어 섞어 분리하고 상층액을 모아 hexane을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 hexane 분획물을 얻는다. 물층에 chloroform 200ml을 넣고 분리하고 하층을 모아 chloroform을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 chloroform 분획물을 얻는다. 다시 물층에 ethylacetate 200ml를 넣어 분리하고 상층액을 모아 ethylacetate를 날린다. 남은 부분을 모아 동결건조하여 ethylacetate 분획물을 얻는다. 다시 물층에 butanol 200ml를 넣어 분리하고 상층액을 모아 butanol을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 butanol 분획물을 얻는다.

위에서 얻은 각각의 약물을 2차 추출용매인 DMSO, chloroform, butanol, H₂O를 이용하여 다시 녹여서 100mg/ml의 농도로 stock solution을 제작하였다.

2) 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 CO₂ 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

(2) 간세포에 대한 약물처리 및 Fas antibody 처리

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 약물손상 유발은 DNA damaging agent인 etoposide를 10µM의 농도로 12시간 자극한 후 한약제에 의한 효능검사를 시행하였다.

실험

1. MTT 반응실험

1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5mg/ml을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22µm의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1×10⁴개의 세포를 포함하고 있는 100µl의 cell suspension에 10µl의 MTT stock solution을 첨가하였다.

2) 효소반응과 면역형광측정

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

2. Cell cycle analysis

Cells pellete(5×10⁶)를 0.2ml PBS에 현탁시킨 후

2ml의 ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정시킨다. PBS에 강력하게 재현탁시킨 후 100 μ g/ml RNase와 40 μ g/ml propidium iodide(PI)가 포함된 PBS에서 37 $^{\circ}$ C로 30분간 배양한 후 세포를 회수하여 FACScan(FACS Caliber cellquest program(Becton Dickinson))을 이용하여 DNA의 양을 정량한다.

3. DNA fragmentation assay

약물을 처리하여 각 시기별로 세포를 회수한 후 PBS로 2회 세척한다. 2ml의 75% cold ethanol/25% PBS를 넣어 세포를 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 고정한다. PBS로 다시 2회 세척한 후 100 μ g/ml RNase와 40 μ g/ml propidium iodide(PI)가 포함된 PBS에서 37 $^{\circ}$ C로 30분간 배양한다. 세포를 회수하여 FACScan(FACS Caliber cellquest program(Becton Dickinson))을 이용하여 절편입자를 정량한다.

4. Cpp32 protease assay for colorimetric p-nitroanilide

100 μ l의 lysis buffer(0.5% NP-40, 0.5mM EDTA, 150mM NaCl and 50mM Tris, pH 7.5)에 세포(7×10^5 cells)를 용해시킨 후 15000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한다. 20 μ l의 cell lysate를 180 μ l의 reaction buffer(100mM, pH7.5 HEPES, 20% Glycerol, 5mM DTT, 5mM EDTA and 100 μ M Peptide substrate)에서 37 $^{\circ}$ C에 방치한다. 405nm에서 ELISA reader를 이용하여 OD값의 변화곡선을 얻는다.

5. Quantitative RT- PCR

1) RNA추출

① GSS solution 제작

250g의 guanidine isothiocyanate를 293ml의 3차 증류수에 넣은 후 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 넣어 65 $^{\circ}$ C에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다.

② Solution D 제작

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 넣어 제작하였다.

③ 10⁷개의 세포에 solution D 500 μ l, 2M sodium acetate 50 μ l (pH 4.0)를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500 μ l, chloroform : isoamyl alcohol(24:1) 100 μ l를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

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

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

2) cDNA 제작

① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

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

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

③ 각 시료에 80 μ 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')

Gene	Primer
GAPDH	2.
	3.
Sequences	Orientation
TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGT	sense
GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense

② Apoptosis-related gene

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

Gene	Primer
FASM	1
	M2
CPP32	1
	2
BCL-2	PM12
	PM14
Bax	B3
	B4

Sequences	Orientation
GATGCTTTAAGCGCATGGCG	sense
GTTTAAACACGGCTCCAATCGG	antisense
CTGGTTTTCGGTTGGGTGTGC	sense
AGCAGCATCGACAGCTGTACC	antisense
CTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTG	sense
TGACTTCACTTGTGGCCAGATAG	antisense
GTGGCAGCTGACATGTTTTTC	sense
AGCTGGGGCCTCAGCCCATC	antisense

4) Quantitative RT-PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10x amplification buffer	10 μ l
Mixture of dNTP(10pM)	5 μ l
GAPDH primer 1(10pM)	2 μ l
GAPDH primer 2(10pM)	2 μ l
Template cDNA	4 μ l
H ₂ O	77 μ l

② GAPDH primer를 이용하여 다음의 조건으로 36 cycles PCR반응을 시행하였다.

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

Annealing	Polymerization
1 min at 59 °C	1 min at 72 °C
1 min at 59 °C	1 min at 72 °C
1 min at 59 °C	10 min at 72 °C

③ PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band

의 밝기를 정량화 하였다.

④ 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 $\pm 20\%$ 내로 정량화 하였다.

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

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

Annealing	Polymerization
1 min at 59 °C	1 min at 72 °C
1 min at 59 °C	1 min at 72 °C
1 min at 59 °C	10 min at 72 °C

결 과

1. MTT assay

茵陳四苓散 각 분획물의 세포독성을 확인하기 위하여, 시료들을 6시간, 12시간, 24시간, 48시간의 4가지로 나누어 처리한 후, MTT assay를 시행하였다. ELISA를 이용한 측정결과는 Table 1.에 작성하였다(각각 2회에 걸쳐 실험하였으며, 평균과 표준편차를 표시하였다). 정상대조군(normal control)과 5가지 용매군을 관찰한 결과 100 μ g/ml의 농도에서는 세포독성을 보이지 않는다는 것이 확인되었으며,茵陳四苓散의 butanol 분획물에서 세포 생존능력 상승이 뚜렷하게 관찰되었다(Table 1).

정상대조군과 etoposide 처리군의 경우 시간별로 OD 차이가 두드러져 etoposide 처리군에서 세포독성에 의한 생존능력 저하가 관찰되었다. Etoposide만 처리한 군과 100 μ g/ml의茵陳四苓散 각 분획물 처리군을 12시간, 24시간의 2가지 시간별로 관찰한 결과 H₂O, butanol, ethylacetate, chloroform에서 시간별로 OD 상승을 보였고 특히 H₂O와 butanol 분획물에서 뚜렷하게 상승하였다(Table 2).

Table 1. The Effect of Each Fractions of *Injinsaryung-San*(*Yinchensiling-san*) on The Viability Cultured Primary Hepatocytes in MTT Assay(*Injinsaryung-San* fractions; 100 μ g/ml)

OD(Optical Density)	6hrs	12hrs	24hrs	48hrs
Normal control	0.682 \pm 0.024	0.663 \pm 0.005	0.708 \pm 0.005	0.713 \pm 0.005
Hexane	0.678 \pm 0.008	0.686 \pm 0.018	0.718 \pm 0.004	0.726 \pm 0.008
Chloroform	0.690 \pm 0.011	0.696 \pm 0.006	0.716 \pm 0.004	0.723 \pm 0.003
Ethylacetate	0.699 \pm 0.006	0.706 \pm 0.009	0.733 \pm 0.006	0.754 \pm 0.001
Butanol	0.710 \pm 0.003	0.765 \pm 0.007	0.795 \pm 0.001	0.809 \pm 0.001
H ₂ O	0.702 \pm 0.003	0.716 \pm 0.001	0.732 \pm 0.001	0.739 \pm 0.004

Table 2. The Effect of Each Fractions of *Injinsaryung-San*(*Yinchensiling-san*) with Etoposide on The Viability Cultured Primary Hepatocytes in MTT Assay(Etoposide ; 10 μ M, *Injinsaryung-San* fractions; 100 μ g/ml)

OD(Optical Density)	12hrs	24hrs
Etoposide only	0.518 \pm 0.007	0.552 \pm 0.004
Hexane	0.505 \pm 0.003	0.573 \pm 0.013
Chloroform	0.561 \pm 0.003	0.611 \pm 0.013
Ethylacetate	0.591 \pm 0.002	0.650 \pm 0.001
Butanol	0.625 \pm 0.006	0.683 \pm 0.013
H ₂ O	0.659 \pm 0.004	0.721 \pm 0.002

Table 3. Cell Cycle Analysis by Flowcytometry

	G1(%)	S(%)
Normal control (untreated)	45.460 \pm 2.022	15.910 \pm 0.141
Hexane	49.595 \pm 0.728	18.460 \pm 0.636
Chloroform	49.510 \pm 0.961	15.960 \pm 0.735
Ethylacetate	50.325 \pm 0.855	16.670 \pm 0.480
Butanol	49.485 \pm 1.011	16.105 \pm 1.011
H ₂ O	51.450 \pm 2.064	15.960 \pm 1.343

2. Cell cycle analysis

정상대조군과 茵陳四苓散 각 분획물을 flowcytometry를 이용하여 세포주기를 분석하였다. G1기, S기, G2기, M기에서 정상대조군과 茵陳四苓散의 5가지 분획물과는 차이가 없었다(Table 3). 따라서 MTT assay에서 나타난 butanol, H₂O, ethylacetate 분획물의 세포활성 증가는 세포분열 활성화에 의한 것은 아닌 것으로 추측된다.

3. DNA fragmentation assay

Fas-mediated apoptosis에 대한 약물의 효과를 알아보기 위하여, 茵陳四苓散 각 분획물과 Fas-antibody를 동시에 투여하여 DNA fragmentation assay를 시행하였다. 먼저 Fas-antibody를 200ng/ml의 농도로 12시간 처리한 후, 茵陳四苓散 각 분획물을 100 μ g/ml의 농도

로 24시간 및 36시간 처리한 후 FACSscan을 시행하였다.

결과는 sub-G1 phase의 apoptotic body가 Fas-antibody만 처리한 군에서는 24시간에 34.3%, 36시간에 54.2%로 증가하였는데, butanol 분획물을 함께 처리한 군은 16.1%, 15.2%로, H₂O 분획물에서는 18.4%, 19.2%로, ethylacetate 분획물에서는 22.5%, 25.5%로 감소하였다(Table 4). 따라서 茵陳四苓散의 butanol 분획물에서 가장 현저하게 apoptosis를 억제하고 H₂O, ethylacetate 분획물도 apoptosis를 뚜렷하게 억제하는 것으로 나타났다.

4. Cpp32 protease assay

Apoptosis signal을 전달하는 세포내 단백질효소의 하나인 Cpp32 protease 활성도를 ELISA를 이용하여 측

Table 4. DNA Fragmentation Assay by FACscan

	24hrs	36hrs
Control(No Fas-antibody)	7.3%	9.2%
Untreated(Fas-antibody only)	34.3%	54.2%
Hexane	31.1%	47.1%
Chloroform	32.4%	45.9%
Ethylacetate	22.5%	25.5%
Butanol	16.1%	15.2%
H ₂ O	18.4%	19.2%

Table 5. The Effect of Each Fractions of *Injinsaryung-San*(*Yinchensiling-san*) in Cpp32 Protease Assay

OD(Optical Density)	30mins	60mins
Fas-antibody only	0.725±0.016	0.796±0.008
Hexane	0.716±0.006	0.747±0.004
Chloroform	0.692±0.019	0.725±0.006
Ethylacetate	0.555±0.023	0.612±0.010
Butanol	0.412±0.012	0.409±0.004
H ₂ O	0.528±0.013	0.497±0.011

Table 6. Quantitative RT-PCR by Densitometry Scanning (Gene / GAPDH)

Gene/ GAPDH	12hrs			24hrs			48hrs		
	Butanol	Ethyl-ace tate	H ₂ O	Butanol	Ethyl-ace tate	H ₂ O	Butanol	Ethyl-ace tate	H ₂ O
Fas	1.624	1.589	1.629	0.826	1.331	1.445	0.571	1.115	1.189
Bax	1.561	1.560	1.481	1.021	1.265	1.307	0.845	1.140	1.253
Bcl-2	1.341	1.287	1.302	1.599	1.264	1.318	1.821	1.201	1.292
Cpp32	1.103	1.209	1.193	1.119	1.211	1.128	1.109	1.205	1.214

정하였다. 200 μ g/ml의 Fas-antibody를 24시간 처리한 후, 茵陳四苓散의 각 분획물들을 100 μ g/ml의 농도로 처리하고 30분, 60분에서 시간별로 관찰하였다. 茵陳四苓散의 각 분획물중 butanol, H₂O, ethylacetate에서 Cpp32 protease activity 저하가 나타났으며, 특히 butanol 에서 뚜렷하게 저하되었다(Table 5). 그러나 이와 같은 butanol, H₂O, ethylacetate 분획물의 Cpp32 protease activity 저하작용은 Cpp32의 activation을 유발하는 Fas 유전자 억제를 통하여 이루어질 가능성도 가지고 있다. 또한 선택적으로 Cpp32 protease를 억제하고 Cpp32 gene에는 영향을 미치지 않을 수도 있다. 따라서 quantitative RT-PCR를 이용하여 유전자에 미치는 영향을 살펴보았다.

5. Quantitative RT-PCR analysis

지금까지의 결과를 토대로 지속적인 apoptosis 억

제효과가 관찰된 butanol, ethylacetate, H₂O 분획물의 유전자 조절효과를 quantitative RT-PCR을 통하여 경시적으로 (12hrs, 24hrs, 48hrs) 분석하였다. 먼저 완충용액을 제작하고 시료를 반응시킨 후 전기영동을 거쳐 결과를 확인하였다. 아울러 RNA를 추출하여 cDNA 및 primer를 제작한 후 PCR을 시행하고 전기영동을 거쳐 densitometer로 정량하였다. 동일한 과정을 2회 반복 실시하여 재현가능성이 높은 결과를 얻었다. 茵陳四苓散의 butanol, ethylacetate, H₂O 분획물은 apoptosis를 유발하는 Fas 및 Bax gene을 억제하였으며, 특히 butanol 분획물은 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2를 증가시켰다. 그러나 butanol, ethylacetate, H₂O 분획물 모두는 Cpp32에는 아무런 영향을 미치지 않았다(Table 6, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4). 따라서 butanol, ethylacetate, H₂O 분획물은 Cpp32 protease를 억제하지만 RT-PCR에서 gene의

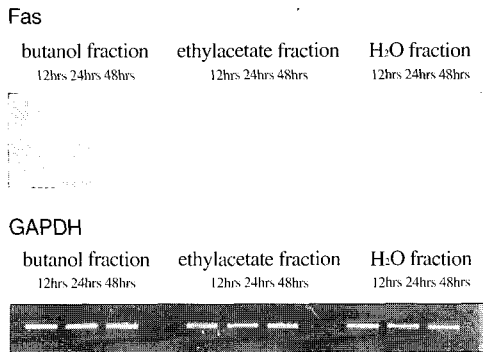


Fig. 1. Fas/GAPDH expression <Quantitative RT-PCR>.

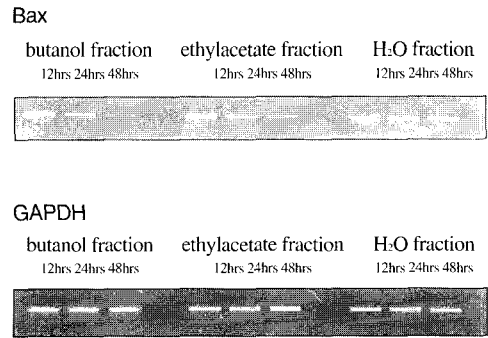


Fig. 2. Bax/GAPDH expression <Quantitative RT-PCR>.

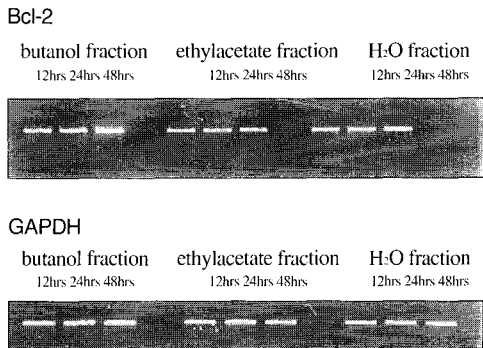


Fig. 3. Bcl-2/GAPDH expression <Quantitative RT-PCR>.

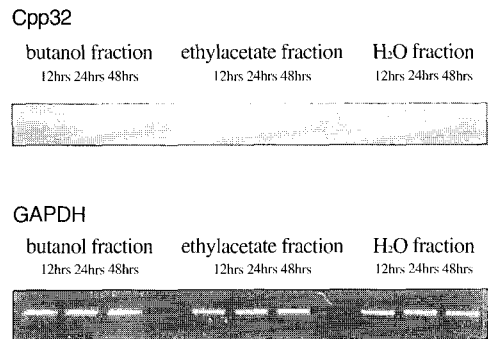


Fig. 4. Cpp32/GAPDH expression <Quantitative RT-PCR>.

발현억제가 나타나지 않아 Cpp32 발현을 억제하는 것이 아니라 활성을 억제하는 것으로 나타났다.

고찰

한의학에서 간질환에 대한 내용은 黃疸, 脹滿, 積聚, 脇痛, 勞倦傷, 酒傷 등에 수록되어 있으며¹⁶⁾, 특히 黃疸는 바이러스성 간염, 알콜성 간염, 간경변증 등 간질환에 임상적으로 적용되고 있다^{25,26)}. 한의학에서 黃疸의 원인은 濕熱, 寒濕, 瘀熱 등이 있지만 주된 원인은 濕熱로 보고 있으며^{14-16,25-27)}, 濕熱을 제거하는 清熱利濕法은 한의학에서 바이러스성 간질환을 치료하는 주된 처방이다^{16,25,26)}.

현재까지 한약물이 간질환에 미치는 영향에 대한 연

구는 주로 清熱利濕을 근간으로 하는 처방을 중심으로 하여 이루어져 왔으며¹⁸⁾, 清熱利濕의 가장 대표적인 처방은 張仲景^{14,15)}의 茵陳五苓散이다. 茵陳五苓散, 茵陳五苓散加減方 그리고 清熱利濕을 근간으로 하는 처방이 간에 미치는 영향에 관한 연구로는 간세포 보호, 담즙 배설 촉진, 바이러스 증식억제, 간섬유화 억제, 간의 염증세포 침윤 억제, 간암 억제 등이 보고되었다¹⁸⁻²²⁾.

본 실험에서 사용한 茵陳四苓散은 茵陳五苓散에서 溫補虛寒하는 肉桂를 除한 처방으로 清熱利濕에 중점을 둔 처방이다. 처방중 茵陳은 清熱利濕, 退黃疸하여 濕熱黃疸, 寒濕黃疸에 사용하며, 간세포 보호, 담즙분비 촉진, 항산화기전 활성화, HBV-DNA 억제, 간암 억제, 지질강하 효능이 있다²⁸⁻³¹⁾. 茯苓은 利水滲濕·健脾和中·寧心安神하며 간세포 보호 작용이 있다^{28,29)}.

猪苓은 利水滲濕하며 간세포 보호와 간의 단백질합성 및 HBsAg 항체형성을 촉진한다^{28,29)}. 澤瀉는 利水滲濕하며 저단백과 고지방사료로 유발되는 지방간을 억제하고 간세포 보호작용이 있다^{28,29)}. 白朮은 補裨益氣, 燥濕利尿하며 간세포를 보호하며 이담작용을 한다^{28,29)}. 甘草는 和諸藥하며 간세포를 보호한다^{28,29)}.

현재 우리나라는 각종 간질환이 40대 사망원인중 가장 높으며 간암으로 인한 사망률은 인구 10만명당 30.3명으로 세계보건통계연감에 발표된 나라중 가장 높은 것으로 나타났다⁴⁾. 그리고 만성 간질환 및 간암 환자의 60 - 70%가 HBsAg 양성으로 HBV가 가장 중요한 간질환의 원인이고, 만성간염, 간경변증, 간암 환자에서 anti-HCV의 발현빈도는 27%, 20%, 17%로 HCV가 HBV 다음으로 큰 비중을 차지하고 있다³⁾. 이와 같이 우리나라에서는 간염 바이러스에 의한 각종 간질환이 만연하고 있는 실정이며 이에 대한 치료약물의 개발이 시급한 실정이다.

한약물에 의한 간염치료에서 김³²⁾과 윤³³⁾은 淸熱利濕을 중심으로 하는 生肝健脾湯과 加減生肝湯이, 우¹⁷⁾는 茵陳四苓散을 기본으로 하는 茵陳淸肝湯이 바이러스성 간염과 알코올성 간염환자에서 환자의 간기능과 임상증상을 호전시켰다고 보고하였는데 한약물이 어떠한 기전에 의하여 간기능 보호작용이 발생하는지는 아직 명확하지 않다. 또한 바이러스성 간염의 병리기전은 주로 바이러스 단백질에 대한 숙주의 면역반응과 바이러스의 직접적인 세포독성에 기인할 것으로 이해되고 있어⁵⁶⁾, 근래에 간질환을 연구하는 방향이 면역학적인 개념으로 전환되고 있다. 방법론적으로는 세포단위의 대사 및 apoptosis에 관여하는 단백질, DNA, RNA의 활성에 따라 발병원인과 전변과정의 상관성을 밝히려 하고 있다. 이에 대한 연구보고로 박³⁴⁾이 茵陳淸肝湯加味方이 간세포보호 및 apoptosis와 연관되는 Bcl-2, Bcl-XL의 활성을 높여 apoptosis를 억제한다고 보고하였으며, 홍³⁵⁾은 茵陳淸肝湯加味方은 Etoposide에 손상된 간세포 보호효과 및 Cpp32, Fas를 억제하고 Bcl-2를 활성화시켜 Fas를 매개로 하여 이루어지는 apoptosis를 억제한다고 보고하였다. 또한 표³⁶⁾는 茵陳四苓散이 HepG2 cell에서

간세포 활성을 상승시키고 세포주기에서 세포증식을 증가시키며 Cpp32 protease 활성도를 감소시키고 Fas, Cpp32를 억제하고 Bcl-2, Bcl-XL을 촉진하는 gene regulation을 통하여 apoptosis를 억제한다고 하였으며, 이³⁷⁾는 단일약물로 茵陳 분획물중 butanol 분획물에서 apoptosis를 억제하는 효과가 높다고 보고하였다.

본 실험은 현재 간질환에 기본방으로 사용되고 있으며, apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 茵陳四苓散^{16,36)}의 활성부위를 밝히고자 하였다. Apoptosis는 세포 위축, 염색체 압축을 특징으로 하는 새로운 형태의 세포사망으로 세포의 팽창, 세포막의 붕괴, 세포내 물질의 유출 등으로 인해 주위에 염증반응을 일으키는 과사와는 다르며 손상되거나 불필요해진 세포를 생명체가 자발적으로 제거하여 생명체를 보존하기 위한 현상으로 밝혀지고 있다^{9,11)}.

Apoptosis는 여러 가지 유전자 산물에 의해 조절되는데¹¹⁾ 현재 apoptosis 유발유전자, apoptosis 억제유전자, apoptosis 매개유전자들이 밝혀지고 있다⁹⁾. 특히 바이러스성 간질환에서 apoptosis를 유발하여 간세포사망에 밀접하게 관여하는 유전자는 Fas(Apo1/CD95)이다^{11,38)}. Fas는 319 아미노산 잔기에서 만들어진 45 kDa의 I형 세포막 관통 단백질이며 apoptosis 유도 signal을 전달하는 수용체분자이고 tumour necrosis factor/nerve growth receptor superfamily의 일원이다³⁹⁾. 그리고 간세포에서 Fas-induced apoptosis가 수행되는데는 protein kinase inhibitor, translation inhibitor, Interleukin-1 β converting enzyme, Cpp32-like cysteine protease의 도움이 필요하다³⁹⁾. 바이러스성 간염으로 B형 간염 바이러스에 감염된 세포는 CTL(cytotoxic T lymphocyte)이 관여하는 면역반응으로 손상되는데, CTL 표면에서 인지되는 FasL(Fas ligand)은 Fas antigen과 부착하면서 apoptosis가 유발된다. 또한 C형 바이러스를 가진 만성활동성 간염환자에서는 Fas antigen이 많이 발견되고, anti-Fas antibody를 투여한 mouse에서는 전격성 간염이 발생하였다. 따라서 Fas에 의한 apoptosis는 바이러스성 간염에서 질병의 악화를 결정하는 중요한 인자로 보

고 있다. 이외에도 악성 간세포 암종에서도 Apo-1 antigen이 발현되고, primary biliary cirrhosis에서 손상된 bile duct의 상피세포에서 Fas가 대량으로 발견되고 있어 Fas는 바이러스성 간염이외의 간질환에서도 질병을 악화하는 주요 인자로 보고 있다. 그리고 Fas를 매개로 이루어지는 apoptosis에는 현재 Bcl-2, Bax, Cpp32 그리고 Cpp32 protease가 관여하는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서茵陳四苓散 각 분획물을 Fas-antibody와 함께 첨가하여 apoptosis를 유발시키고 DNA fragment를 측정하였는데, butanol 분획에서 가장 현저하게 apoptosis를 억제하였으며 ethylacetate, H₂O 분획물도 apoptosis를 뚜렷하게 억제하는 것으로 나타났다. Fas를 매개로 하는 apoptosis는 Cpp32 protease가 감소하면 억제되는데⁴⁰⁾ apoptosis 억제효과와 apoptosis signal을 전달하는 세포내 단백질소인 Cpp32 protease와의 관계를 규명하기 위하여 Cpp32 protease activity를 ELISA를 이용하여 측정하였다. 측정결과茵陳四苓散 각 분획물의 Cpp32 protease 활성억제는 butanol 분획물에서 가장 현저하였고 H₂O, ethylacetate, hexane, chloroform 순이었다.

세포활성검사, 세포주기 분석, anti-Fas로 유발되는 apoptosis와 Cpp32 protease 활성억제 분석에서茵陳四苓散의 butanol, H₂O, ethylacetate 분획물은 지속적으로 apoptosis를 뚜렷하게 억제하는 것으로 나타났으며, 이들의 유전자 조절 작용을 quantitative RT-PCR로 분석한 결과茵陳四苓散의 butanol, ethylacetate, H₂O 분획물은 apoptosis를 유발하는 Fas 및 Bax gene을 억제하였고 apoptosis를 억제하는 Bcl-2 gene은 butanol 분획물에서만 증가하였으며 H₂O, butanol, ethylacetate 분획물은 모두 Cpp32 gene에는 영향을 미치지 않았다. 따라서茵陳四苓散의 butanol, ethylacetate, H₂O 분획물은 Cpp32에는 영향을 미치지 않고 선택적으로 Cpp32 protease를 억제하며 apoptosis를 유발하는 Fas와 Bax를 억제하였다. 특히 butanol 분획물은 apoptosis를 억제하는 Bcl-2를 증가시켜 가장 유효한 분획물로 인정되었다.

결론

茵陳四苓散 각 분획물이 간세포의 활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 확인하고자 MTT assay, cell cycle analysis, DNA fragmentation assay, Cpp32 protease assay를 시행하고, 각 유전자의 발현을 파악하기 위하여 quantitative RT-PCR을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay 결과茵陳四苓散의 butanol 분획물에서 가장 현저한 활성증가를 보였으며 H₂O, ethylacetate에서도 활성증가가 나타났다. Etoposide와茵陳四苓散 각 분획물을 함께 투여한 경우에는 H₂O 분획물에서 가장 현저한 활성증가를 보였으며 butanol, ethylacetate에서도 뚜렷한 활성증가가 나타났다.
2. Cell cycle analysis의 결과茵陳四苓散 분획물은 세포주기에 영향을 미치지 않았다.
3. Cpp32 protease activity assay결과茵陳四苓散의 butanol, H₂O, ethylacetate 분획물이 Cpp32 protease의 활성을 저하시켰으며, butanol 분획물에서 가장 현저하였다.
4. DNA fragmentation assay 결과茵陳四苓散의 butanol, H₂O, ethylacetate 분획물은 apoptosis를 억제하는 것으로 나타났으며, butanol 분획물에서 가장 현저하게 나타났다.
5. Quantitative RT-PCR 결과茵陳四苓散의 butanol, ethylacetate, H₂O 분획물은 Fas 및 Bax gene을 억제하였고, Bcl-2 gene은 butanol 분획물에서만 증가하였다. Butanol, ethylacetate, H₂O 분획물의 경우 Cpp32 gene에는 영향을 미치지 않았다.

이상의 실험결과에서茵陳四苓散의 각 분획물은 HepG2 cell에서 간세포활성을 높이고 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포손상을 억제하는 것으로 나타났으며 이러한 효과는 butanol 분획물에서 가장 현저하게 나타났다.

참고문헌

1. 김주현, 김연수, 서동진. 한국인 간세포암환자에서 HBsAg 및 Anti-HCV의 발현상. 대한내과학회지. 1994;46(2):181-191.
2. Kim CY, Lee HS, Han CJ. Relative etiologic role of hepatitis B virus and hepatitis C virus in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma among age-specific groups in Korea: the possible of non-B, non-C agents. Seoul J Med. 1993;34:27-33.
3. Lee HS, Byun JH, Kim CT. Etiology and outcome of acute viral hepatitis in Korean adults. J Korean Med Sci. 1990;5:149-154.
4. 통계청. 98연도 사망원인통계결과. 서울. 1999:23-27.
5. 이관식. B형 바이러스성 만성 활동성 간염환자에서 스테로이드 이탈요법 및 알파 인터페론 투여에 의한 면역상태의 변화. 서울:연세의대학위논문집. 1993;242-243.
6. SN HUANG, TC CHEN, SL TSAI, YF LIAW. Histopathology and pathobiology of hepatotropic virus-induced liver injury. Journal of Gastroenterology and Hepatology(Suppl). 1997;195-217.
7. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell mediated cytotoxicity. Science. 1994;265:528-530.
8. Hayashi N, Mita E. Fas system and apoptosis in viral hepatitis. J Gastroenterol Hepatology. 1997;12:9-10,223-226.
9. 김창민. 아포토시스와 간질환. The Korean Journal of Hepatology. 1996;2(2):96-103.
10. Kerr JF, Willie AH, Currie AR. Apoptosis; a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kentic. Br J cancer. 1972;26:239-257.
11. Solary E, Dubrez L, Eymin B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. Eur Respir J. 1996;9(6):1293-1305.
12. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, and Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature. 1993;364:806-809.
13. Nakamoto Y, Guidotti LG, Paschetto V, Schreiber RD, ChisariFV. Differential target cell sensitivity to CTL-activated death pathways in hepatitis B virus transgenic mice. J Immunol. 1997;158(12):5692-5697.
14. 張仲景. 仲景全書. 서울:高文社. 1984:225,408-411.
15. 張仲景. 金匱要略. 서울:杏林書院. 1984:392-394.
16. 全國 韓醫科大學 肝系內科學教授 共著. 肝系內科學. 서울:東洋醫學研究院. 1992:33,230-232.
17. 禹弘楨. 慢性B型肝炎에 대한 茵陳清肝湯의 效果. 大韓韓醫師協會. 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 (肝臟編). 1995;18-53.
18. 李長勳. 肝炎治療劑의 效能에 關한 實驗的 研究. 大韓韓醫師協會. 第2回 韓·中 學術大會參加論文集 (肝臟編). 1995;123-163.
19. 金榮哲. 茵陳清肝湯의 安全性에 關한 研究. 경희한의대논문집. 1997;20(1):57-89.
20. 朴亨圭, 金東佑, 李長勳, 禹弘楨, 金秉雲. 茵陳五苓散이 급성 alcohol, 고지혈증 및 Galactosamine 중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1993; 14(2):254-269.
21. 愼相萬, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳四苓散과 小柴胡湯이 ANIT로 유발된 담즙정체성 간장애에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1996;17(2):214-226.
22. 표임정, 이장훈, 우홍정, 김병운. 茵陳四苓散이 흰쥐 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995; 16(2): 281-294.
23. 경희의료원. 한약규격집. 서울:대성문화사. 1993:14-17,73-75,98-100,179,185-186,253-254.
24. 이상인, 지형준. 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서. 서울:한국메디칼인텍스사. 1989:93,194,306, 349,364,370,451,521,525, 527,531,598,618.
25. 趙伯智. 關幼波肝病百問答. 北京:華夏出版社. 1993:30,102-108.
26. 洪嘉禾. 實用中醫肝病學. 上海:上海中醫學院出版社. 1993:660-668.
27. 許凌. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1989:415,431-432,496, 569,726.
28. 李尙仁. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1982:171-179,358-364.
29. 辛民教. 臨床本草學. 서울:남산당. 1986:172,250-251,594,602.
30. 송효정, 김진웅, 김성훈. 간암주와 S-180에 관한 茵陳 분획의 항종양효과. 동의병리학회지. 1995;10:129-162.
31. 우홍정. 한약재가 HBV증식 억제에 미치는 효과에 관한 연구. 한국한의학연구원. 1998:31-35.
32. 金秉雲. 慢性肝炎 3,136例에 대한 臨床分析과 生肝

- 健脾湯의 治療效果. 大韓韓醫學會誌. 1993;14(1):216.
33. 尹相協, 柳在煥, 張文錫. 加減生肝湯이 알코올성 간 질환의 간기능 변동에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1993;14(2):348-354.
 34. 朴容禎, 金榮哲, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯加味方이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(1):145-164.
 35. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕가미방이 간세포활성, 세포주기 및 Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(2):337-372.
 36. 표임정, 이장훈, 우홍정. 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1999;22(1):119-140.
 37. Jong-Hoon Yi, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo. Effects of Five Fractions of *Artemisia capillaris* THUNB on Fas-mediated Apoptosis in HepG2 Cells. *Journal of Oriental Medicine*. 1999;4(1):41-45.
 38. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med*. 1997;3(4):409-413.
 39. Rouquet N, Carlier K, Briand P, Wiels J, and Joulin V. Multiple pathways of Fas-induced Apoptosis in primary Culture of Hepatocytes. *Bio. and Biophy. Res. COM*. 1996;229:27-35.
 40. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, and Reed JC. Immunohistochemical Analysis of in Vivo Patterns of Expression of CPP32(Caspase-3), a Cell Death Protease. *Can. Res*. 1997;57:1605-1613.