

원 저

淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine 발현에 미치는 影響

김병삼, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of *Chungganhaeju-tang* (*Qingganjiejiu-tang*) on Ethanol-mediated Cytokine Expression

Byung-Sam Kim, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Object : This study was designed to investigate the effects of *Chungganhaeju-tang* (*Qingganjiejiu-tang*) on cytotoxicity, growth inhibition, apoptosis and expression of cytokine in damaged HepG2 cells.

Method : Toxicity on HepG2 cell induced by ethanol and acetaldehyde was measured for viability, cell growth, DNA replication and generation of apoptosis and cytokine. The recovery of the cell activity by *Chungganhaeju-tang* was estimated for the measured parameters using PCR with different cycle numbers, DNA gel-electrophoresis, and densitometric analysis.

Results : *Chungganhaeju-tang* improves the recovery of HepG2 cells damaged by ethanol or acetaldehyde. The suppressed DNA synthesis of the cell damaged by ethanol or acetaldehyde is improved by *Chungganhaeju-tang*. A liver-protection effect was shown by the reduction of apoptosis and TNF- α , IL-1 β expressions that are induced by ethanol or acetaldehyde.

Conclusion : The result indicates that *Chungganhaeju-tang* reduces toxicity induced by ethanol or acetaldehyde and recovers damaged liver function. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(1):190-201)

Key Words: *Chungganhaeju-tang* (*Qingganjiejiu-tang*), cytokines, TNF- α , IL-1 β

서 론

최근 우리나라의 알코올 소비량은 생활양식의 변화와 사회 문화적 요인으로 점차 증가하고 있으며¹⁾, 이에 따른 알코올성 간질환도 만성 간질환 중에 5-10%정도를 차지할 정도로 최근 그 비율이 점점 증가하고 있는 추세이다²⁾. 따라서 우리나라의 주된 간질환의 원인으로 알려진 바이러스성 간염뿐만 아니

라, 알코올로 인한 간질환에 대한 대책이 시급한 실정이다.

최근 알코올성 간질환의 치료 약물 개발에 관한 연구로 anti-cytokine therapy가 주목을 받고 있는데, 이는 간 내의 염증과 섬유화증에 관련된 cytokine을 무력화시키는 cytokine항체, cytokine결합억제제, cytokine 생성 조절제와 같은 방법들이며 이와 같은 일련의 방법들은 간손상에 대한 치료약물의 가능성을 보여준다고 할 수 있다³⁾. 간세포의 염증과 관련된 cytokine 유전자인 TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8 등의 발현정도와 간손상 정도와는 상당한 연관성이 있다고 알려져 있으며⁴⁻⁶⁾, 모두 간조직의 감염이 시작

· 접수: 2003년 1월 14일 · 채택: 2003년 2월 15일
· 교신저자: 이장훈, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9115, Fax. 02-958-9120, E-mail: komclive@khmc.or.kr)

또는 진행되는 과정에서 그 발현이 증가한다.

알코올성 간질환은 한의학적으로는 酒傷에 속한다. 본 실험에 사용된 淸肝解酒湯은 酒傷에 사용되는 대표적인 처방으로 對金飮子에 茵陳四?散을 합방하고 葛根과 赤楊 등을 가미하여 구성된 방제이다. 淸肝解酒湯의 실험 연구로 郭 등²⁾이 알코올 대사과정에서 아세트알데히드의 생성을 억제하고 알코올로 인하여 감소된 혈중 glucose를 회복시키고 증가된 triglyceride 및 BUN, 혈중 AST, ALT, ALP, LDH 및 uric acid를 유의성 있게 감소시켜 알코올에 의해 저하된 간기능을 회복시키는 작용이 있음을 보고하였고, 李 등³⁾은 알코올성 지방간 환자에서 상승되어진 AST, ALT, GGT, TG 수치가 淸肝解酒湯의 투여 후 유의한 감소와 임상증상의 개선효과가 있음을 보고한 바 있다.

이에 저자는 에탄올과 아세트알데히드에 의해 유도되어지는 cytokine의 발현 특징과 이에 대한 淸肝解酒湯의 영향을 분석하기 위해 淸肝解酒湯이 HepG2 cell의 활성화, DNA합성 및 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하였다. 이와 함께 처리 농도에 따른 유전자 발현의 변화 양상을 RT-PCR을 통하여 분석하여, 淸肝解酒湯이 TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8 등 에탄올 매개성 cytokine 발현에 뚜렷한 영향을 미치는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 淸肝解酒湯은 경희의료원 한방병원 처방집⁴⁾에 근거하여 경희의료원 한방병원 약재과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며, 그 처방의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총시료 118g에 3차 증류수 1000ml를 넣고 2시간씩 2회 환류추출한 후 얻은 전탕액을 면으로 여과하여 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여

Table 1. Prescription of Chungganhaeju-tang

| 韓藥名 | 生藥名 | Dose |
|-------|-------------------------------------|------|
| 茵 陳 | <i>Artemisiae capillaris Herba</i> | 30g |
| 陳 皮 | <i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i> | 12g |
| 葛 根 | <i>Puerariae Radix</i> | 12g |
| 赤 楊 | <i>Alny Cortex et Ramulus</i> | 12g |
| 白 朮 | <i>Atractylodis Rhizoma Alba</i> | 8g |
| 茯 苓 | <i>Hoelen</i> | 8g |
| 澤 瀉 | <i>Alismatis Rhizoma</i> | 8g |
| 豬 苓 | <i>Polyporus</i> | 8g |
| 厚 朴 | <i>Machili Cortex</i> | 8g |
| 貢砂仁 | <i>Amomi Fructus</i> | 6g |
| 甘 草 | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 6g |
| Total | | 118g |

32.4g의 건조추출물을 얻어 27.46%의 수율을 보였다. 이 추출물을 110ml의 DMEM(Gibco) 배지에 첨가하고 37℃에서 3시간 동안 교반(stirring)하였다. 이를 원심분리하여 상청액을 0.45 μ m의 Milipore 필터로 여과 멸균하여 4℃에서 보관하였다. 실험 전에 추출액을 37℃에서 2시간 동안 배양하여 배지에 처리하였다.

2. 방법

1) 세포배양

인체의 간세포주인 HepG2를 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하여 10% FBS(fetal bovine serum)을 함유한 DMEM(Gibco) 배지에서 배양하였다. 세포들은 5%의 CO₂ 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

2) 간세포에 대한 약물처리

HepG2 cell을 배양하여 50-60%의 confluence를 보일 때 최종 농도가 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml이 되게 처리하여 시간대별로 6-72시간 분석하였다. 이러한 처리는 검액 단독 또는 에탄올(1, 10, 50, and 100mM)이나 아세트알데히드(10, 100, 200, and 400 μ M)와 함께 처리하였다. 이후 세포는 유전자 발현과 apoptosis를 분석하기 위하여 trypsin-EDTA 처리방법으로 세포를 회수하였다.

실 험

1. MTT Assay

1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5mg/ml을 PBS(phosphate buffered saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22 μ m의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1×10^6 개의 세포를 포함하고 있는 100 μ l의 cell suspension에 10 μ l의 MTT stock solution을 첨가하였다.

2) 효소반응과 면역형광 측정

MTT stock solution을 첨가한 cell suspension을 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양한 후 100 μ l의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals을 완전히 용해시켰다. 용해가 끝난 뒤 570nm에서 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader로 OD(optical density)를 측정하였다.

2. 세포 증식 분석

1) 세포수 측정

HepG2 cell을 6 well plate에 한 well당 1×10^6 개씩 넣고 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 첨가하였다. 24시간 후에 well 안의 세포들을 PBS로 두 번 세척하고, 다양한 농도의 검액이 포함되어 있는 1% FBS 함유 배지를 넣어주었다. 세포수는 24시간 간격으로 3일간 조혈세포측정기를 이용하여 측정하였다.

2) [3 H]thymidine incorporation assay

DNA 합성은 [3 H]thymidine의 incorporation을 결정함으로써 측정된다. 24 well plate에 well당 2×10^6 개의 세포를 넣고, 10% 혈청이 포함된 DMEM 배지를 첨가하였다. 24시간 후에 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 각각 1, 10, 100 μ g/ml의 검액이 포함되어 있는 무혈청 배지를 넣어 20시간 동안 배양하였다. 이후, 세포들에 [3 H]thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)을 1 μ Ci/ml의 농도로 4시간 동안 처리하여 trichloroacetic acid로 침전시킬 수 있는 물질에 삽입된 방사능을 액체섬광계측기로 측정하였다.

3. Tryphan blue exclusion에 의한 apoptosis 분석

조혈세포측정기를 이용한 apoptosis 분석을 위해, 세포를 침전시켜 상청액을 제거한 후 원심분리하여 얻은 세포 덩어리를 차가운 PBS에 5×10^6 cells/ml 농도가 되도록 재현탁하였다. 현탁액 0.5ml를 slide 위에 놓고 tryphan blue solution으로 염색하여 조혈세포측정기를 이용하여 죽은 세포수를 세었다.

4. RT-PCR

1) RNA 추출

GSS 용액(250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6ml의 0.75M sodium citrate, 26.4ml의 10% sarkosyl 및 293ml의 ddH $_2$ O)에 2-mercaptoethanol을 최종 농도가 0.1M이 되게 첨가하여 용액 D를 만들었다. 원심분리하여 얻은 세포 덩어리에 500 μ l의 용액 D와 50 μ l의 2M sodium acetate (pH 4.0)를 순서대로 첨가하고 교반(vortexing)하였다. 여기에 500 μ l의 water-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)을 섞고 20초간 교반한 후, 15분 동안 얼음에 방치하였다. 15000rpm에서 20분간 원심분리한 후에 상층액을 회수하여 다시 1000 μ l의 차가운 isopropanol과 섞은 후, -70 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 방치하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 다시 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 회수한 후에, 이를 각 100%와 70%의 에탄올로 세척하였다. 이렇게 준비된 RNA는 30 μ l의 RNase가 없는 물에 녹였다. RNA의 농도는 260nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하여(Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA.) 정량하였으며, 260nm에서 흡광도 1은 40 μ g/ml의 RNA로 계산하였다.

2) cDNA의 제작

MoMuLV(Gibco) 키트와 random hexamer primer를 사용하여 RNA를 역전사(reverse transcription)하였다. 우선, 1 μ g의 RNA를 2 μ l의 transcriptase buffer, 1 μ l의 random hexamer (10pM), 1 μ l의 MoMuLV-RT (10U/ μ l), 1 μ l의 dNTP (10pM) 및 0.5 μ l의 RNase inhibitor 등에 혼합하였다. 이 반응액을 23 $^{\circ}$ C에서 15분간, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 순서대로 방치하였다.

한 RNA로부터 각 두 개의 cDNA를 준비하였으며, 이들은 1:4 또는 1:8의 비율로 증류수에 희석하여, 다음의 PCR 반응을 위해 준비하였다.

3) Primer의 제작과 RT-PCR analysis

사용된 oligonucleotide primer들과 그 서열은 Table 2와 같다. 유전자 발현을 정량적으로 분석하기 위해서, 사이클 수를 증가시켜가며 (21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 및 42회) PCR을 하거나, cDNA를 희석시켜 가며 (1:0, 1:2, 1:4, 및 1:8) 수행하였다. 각 사이클은 95℃에서 1분간 denaturation, 58-62℃에서 45초간 annealing 및 72℃에서 1분간의 extension으로 이루어졌다. 이 과정에서 50µl의 PCR 반응액에 들어 있는 12.5-25ng의 cDNA가 26-34회의 사이클을 거치면, house keeping gene인 GAPDH(Glyceraldehyde-3-Phosphate-dehydrogenase)를 포함한 모든 유전자들이 증폭의 logarithmic 상태에 들어갔다. RT-PCR product들은 2% agarose gel(FMC, Rockland, ME)에서 110 볼트로 1시간 동안 전기영동하여 분석하였다. Gel들은 ethidium bromide가 1X TBE에 0.5µg/ml 녹아 있는 용액에서 30분간 염색하고 1X TBE에서 15분간 destain한 후, 자외선에 비추어 PCR product들을 관찰하고 사진을 찍었다. Photographic negative는 증류수에 담가서 씻고, 공기 중에서 말렸다. 증폭된 각 유전자들에 대한 RT-PCR의 특이성은 biotin으로 표지한 internal oligonucleotide 탐침을 사용하여 southern blot으로 분석하였으며, 검출은 chemiluminescent를 이용

하였다. 각 유전자 발현의 정량화는 ethidium bromide로 염색한 gel을 레이저 densitometer로 스캐닝하여 할 수 있었다. 바탕 부분의 signal을 뺀 후에, house keeping gene에 대한 면적비를 이용하여, 각 유전자의 발현량을 정량하였다. 이러한 정량적 RT-PCR 실험은 각 cDNA에 대해서 적어도 2회 이상 반복되었다 (Table 2).

4) DNA gel electrophoresis

1×10⁶ 세포들을 0.1% Triton-X 100, 50mM Tris, pH 7.0, 10mM EDTA 및 0.1mg/ml proteinase K 등의 조성을 가진 추출용 buffer에 현탁하였다. 그리고, 37℃에서 8시간 동안 방치한 후에, Tris-saturated phenol과 2회의 phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 및 1회의 chloroform/ isoamyl alcohol (24 : 1) 추출 방법을 사용하여 DNA를 준비하였다. 다시 에탄올 침전을 하룻밤 동안 수행하여 DNA를 침전시킨 후, 증류수에 녹여서 2% agarose gel을 사용하여 분석하였다.

5) RT-PCR products의 densitometric analysis

Signal의 세기에 대한 분석에는 레이저 densitometer (Bio-Rad)와 Molecular Analyst 프로그램(버전 2.0)을 사용하였다(IBM compatible computer 사용). Photographic negative에서 RT-PCR products와 negative control의 면적은 차례로 스캐닝하였고, negative control의 바탕 부분의 세기를 빼어 주었다. 이러한 수정 후에, 각 면적비는 house keeping gene

Table 2. Oligonucleotide Primers Used for a Quantitative RT-PCR Analysis (All sequences are listed 5' to 3')

| Gene | Primer | Sequences | Orientation |
|--------|--------|--------------------------|-------------|
| GAPDH | 2 | TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTG | Sense |
| | 3 | GACCATGAGAAGTATGACAACAGC | Antisense |
| TNF-α | S | CACACCTTAAGCTGCCCAGA | Sense |
| | AS | GCTCTCCAGAGCAGTGAGTT | Antisense |
| TGF-β1 | S | CACITGCAGGAGCGCACGATCATG | Sense |
| | AS | TTTCTGCTTCTCATGGCCACCCC | Antisense |
| IL-1β | S | ATGGCGGCATCCAGCTACGA | Sense |
| | AS | ACGCAGGACAGGTACAGATT | Antisense |
| IL-6 | S | ATCTGGATTCAATGAGGAGA | Sense |
| | AS | ATAAGTICTGTGCCCACTGG | Antisense |
| IL-8 | S | CCATCATGATAGCATCTGTA | Sense |
| | AS | AAGTTTGTGCCTTATGGAGT | Antisense |

(GAPDH)에 대하여 상대적으로 계산하여 그 유전자의 발현량과 연관시킬 수 있었다.

결 과

1. 에탄올과 아세트알데히드가 cytokine 발현에 미치는 영향

1) 세포 독성에 미치는 영향 (MTT assay)

먼저 HepG2 cell에서 에탄올과 중간대사물인 아세트알데히드에 의한 세포독성을 알아보기 위하여 세포활성을 측정하였다. HepG2 cell에 1, 10, 50, 100mM의 에탄올을 투여하고 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 시행하였다. 정상대조군과 처리군을 비교한 결과 에탄올을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 투여한 에탄올 양이 증가할수록 세포활성은 현저히 감소하였다. 에탄올 대신 10, 100, 200, 400 μ M의 아세트알데히드를 투여한 경우에도 아세트알데히드의 투여량이 증가할수록 세포활성이 현저히 감소하였다(Table 3).

2) 세포 증식 억제 (Cell counting)

에탄올과 아세트알데히드가 HepG2 cell 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 세포수를 측정하였다. 에탄올이 투여되지 않았을 경우에는 HepG2 cell 수가 24시간, 48시간, 72시간이 경과하였을 때 각각 두 배 정도 증가하였으나, 투여 후는 투여량에 비례하여 증가의 속도가 둔해짐을 확인 할 수 있었다. 아세트알데히드의 경우에도 비슷한 결과가 나타났다(Table 4).

3) DNA 합성 억제 ($[^3\text{H}]$ Thymidine incorporation assay)

에탄올과 아세트알데히드가 HepG2 cell의 DNA 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assay를 시행하였다. HepG2 cell에 1, 10, 50, 100mM의 에탄올을 투여 후 48시간이 경과 후에 $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assay를 시행하였을 때, 에탄올 투여량에 비례하여 DNA 합성이 억제됨을 확인하였다. 10, 100, 200, 400 μ M의 아세트알데히드를 투여하고 48시간이 경과 후 측정하였을 경우에도 에탄올 투여 때와 같이 투여량에 비례하여 DNA 합성이 억제됨을 확인할 수 있었다(Table 5).

Table 3. Cell Viability of Ethanol-treated and Acetaldehyde-treated HepG2 Cells

| | Ethanol(mM) | | | | | Acetaldehyde (μ M) | | | | |
|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 | 0 | 10 | 100 | 200 | 400 |
| Exp.1 | 0.263 | 0.209 | 0.182 | 0.110 | 0.082 | 0.263 | 0.244 | 0.197 | 0.125 | 0.096 |
| Exp.2 | 0.256 | 0.223 | 0.177 | 0.105 | 0.093 | 0.256 | 0.241 | 0.188 | 0.130 | 0.099 |

Cells were treated with ethanol (1-100 mM) or acetaldehyde (10-400 μ M) for 48 hours.

Table 4. Cell Counting Assay for the Effect of Ethanol and Acetaldehyde on Cell Growth of HepG2

| Hours | Ethanol (mM) | | | | | Acetaldehyde (μ M) | | | | |
|-------|--------------|------|------|------|------|-------------------------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 | 0 | 10 | 100 | 200 | 400 |
| 24 | 1.34 | 1.26 | 1.21 | 1.01 | 0.93 | 1.34 | 1.29 | 1.27 | 1.11 | 0.95 |
| 48 | 2.98 | 2.42 | 1.93 | 1.53 | 1.14 | 2.98 | 2.72 | 2.31 | 1.43 | 1.02 |
| 72 | 5.72 | 2.94 | 2.12 | 1.88 | 1.36 | 5.72 | 3.21 | 3.01 | 1.72 | 1.14 |

Cells were treated with ethanol (1-100 mM) or Acetaldehyde (10-400 μ M) for 24-72 hours and cell number ($\times 10^5$) were counted using hemocytometer. Values represent cells/well.

Table 5. Effect of Ethanol and Acetaldehyde on DNA Replication of HepG2 Cells

| | Ethanol (mM) | | | | | Acetaldehyde (μ M) | | | | |
|-------|--------------|------|------|------|------|-------------------------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 | 0 | 10 | 100 | 200 | 400 |
| Exp.1 | 4700 | 4450 | 3700 | 3100 | 2450 | 4700 | 4550 | 3950 | 2950 | 2300 |
| Exp.2 | 4550 | 4250 | 3550 | 3150 | 2250 | 4550 | 4450 | 4050 | 2850 | 2050 |

Cells were treated with ethanol (1-100 mM) or acetaldehyde (10-400 μ M) for 48 hours and DNA synthesis was measured by $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assay (CPM)

4) Apoptosis 유발 (Tryphan blue exclusion assay)

에탄올과 아세트알데히드에 의한 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 tryphan blue exclusion assay를 시행하였다. 1, 10, 50, 100mM의 에탄올을 투여하고 48시간이 경과 후, 측정 결과 에탄올 투여량에 비례하여 죽은 세포수는 현저히 증가하였다(Table 6). 아세트알데히드를 투여했을 경우에도 투여량에 비례하여 죽은 세포수가 증가함을 확인할 수 있었다(Table 6).

5) Cytokine 유전자 발현 유발 (RT-PCR analysis)

HepG2 cell에서 에탄올과 아세트알데히드가 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 에탄올을 농도별로 48시간 동안 처리하여 TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8의 발현량을 RT-PCR을 통하여 분석하였다. 그 결과 TNF- α , TGF- β 1과 IL-1 β 는 에탄올 투여량에 비례하여 발현량이 뚜렷하게 증가하였으나 IL-6, IL-8은 약간 증가하는 데 그쳤다. 아세트알데히드를 농도별로 처리한 경우에도 TNF- α , TGF- β 1과 IL-1 β 는 투여량에 비례하여 발현량이 현저히 증가하였으나 IL-6는 미미한 증가에 그쳤으며, IL-8은 거의 변화가 없었다(Table 7).

2. 淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine 발현에 미치는 영향

1) 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 cytotoxicity에 미치는 영향 (MTT assay)

淸肝解酒湯이 에탄올과 중간대사물인 아세트알데히드로 유발된 cytotoxicity에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 시행하였다. 에탄올과 아세트알데히드를 투여하기 4시간 전에 검액을 1, 10, 100 μ g/ml 투여하고 에탄올(50mM)과 아세트알데히드(400 μ M)로 각각 48시간 동안 처리하였다.

에탄올을 처리하지 않은 세포에서 뿐만 아니라 에탄올 또는 아세트알데히드를 처리한 세포의 경우에도 대조군에 비해 검액의 농도에 비례하여 세포활성이 증가하였다(Table 8).

2) 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 세포증식 억제 및 DNA 합성에 미치는 영향 (3 H]thymidine incorporation assay)

淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 세포증식 억제 및 DNA 합성에 미치는 영향을 분석하기 위해, 에탄올과 아세트알데히드를 투여하기 4시간 전에 검액을 1, 10, 100 μ g/ml 투여하고 에탄올(50mM)과 아세트알데히드(400 μ M)로 각각 48시간

Table 6. Apoptotic Death of HepG2 Cells by Ethanol and Acetaldehyde

| | Ethanol (mM) | | | | | Acetaldehyde (μ M) | | | | |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 10 | 50 | 100 | 0 | 10 | 100 | 200 | 400 | |
| Exp.1 | 436 | 499 | 898 | 1311 | 1582 | 436 | 485 | 903 | 1198 | 1502 |
| | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 |
| Exp.2 | 443 | 511 | 909 | 1297 | 1614 | 443 | 489 | 899 | 1180 | 1463 |
| | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 |

Cells were treated with ethanol (1-100 mM) or acetaldehyde (10-400 mM) for 48 hours and apoptotic cell death was determined by tryphan blue exclusion assay. Values represent dead cells/total cells.

Table 7. RT-PCR Analysis of Cytokine Gene Expression in Ethanol-treated and Acetaldehyde-treated HepG2 Cells

| Cytokines | Ethanol (mM) | | | | | Acetaldehyde (μ M) | | | | |
|----------------|--------------|------|------|------|------|-------------------------|------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 | 0 | 10 | 100 | 200 | 400 |
| TNF- α | 1.00 | 0.97 | 1.43 | 2.04 | 2.54 | 1.00 | 1.13 | 1.51 | 2.43 | 2.92 |
| TGF- β 1 | 1.00 | 1.14 | 1.67 | 1.98 | 2.34 | 1.00 | 1.42 | 1.77 | 2.41 | 3.04 |
| IL-1 β | 1.00 | 1.06 | 1.43 | 1.68 | 1.83 | 1.00 | 1.12 | 1.78 | 2.89 | 2.32 |
| IL-6 | 1.00 | 0.93 | 1.04 | 1.32 | 1.65 | 1.00 | 1.03 | 0.93 | 1.16 | 1.43 |
| IL-8 | 1.00 | 0.97 | 0.96 | 1.05 | 1.11 | 1.00 | 0.95 | 1.06 | 1.12 | 1.05 |

Cells were treated with ethanol (1-100 mM) or acetaldehyde (10-400 mM) for 48 hours and gene expression level (target/GAPDH) was examined using RT-PCR analysis.

Table 8. Effect of CGHJT on Ethanol-induced and Acetaldehyde-induced Cytotoxicity (MTT assay)

| CGHJT($\mu\text{g/ml}$) | Ethanol-untreated | | | | Ethanol (50 mM) | | | |
|---------------------------|-------------------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 | 0 | 1 | 10 | 100 |
| Exp.1 | 0.242 | 0.251 | 0.277 | 0.276 | 0.107 | 0.162 | 0.195 | 0.199 |
| Exp.2 | 0.239 | 0.260 | 0.269 | 0.282 | 0.099 | 0.151 | 0.192 | 0.212 |

| CGHJT($\mu\text{g/ml}$) | Acetaldehyde-untreated | | | | Acetaldehyde (400 μM) | | | |
|---------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 | 0 | 1 | 10 | 100 |
| Exp.1 | 0.242 | 0.262 | 0.269 | 0.263 | 0.094 | 0.142 | 0.167 | 0.189 |
| Exp.2 | 0.239 | 0.261 | 0.258 | 0.265 | 0.092 | 0.144 | 0.170 | 0.197 |

Cells were treated with ethanol(50 mM) or for acetaldehyde (400 μM) 48 hours in the presence of CGHJT (1-100 $\mu\text{g/ml}$) 4 hours before. Values represent optical density at absorbance of 570nm.

Table 9. Effect of CGHJT on Ethanol-induced and Acetaldehyde-induced Growth Inhibition

| CGHJT($\mu\text{g/ml}$) | Ethanol-untreated | | | | Ethanol (50 mM) | | | |
|---------------------------|-------------------|------|------|------|-----------------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 | 0 | 1 | 10 | 100 |
| Exp.1 | 4550 | 4450 | 4300 | 4200 | 3200 | 3250 | 3550 | 3850 |
| Exp.2 | 4700 | 4500 | 4450 | 4150 | 3150 | 3100 | 3650 | 3800 |

| CGHJT($\mu\text{g/ml}$) | Acetaldehyde-untreated | | | | Acetaldehyde (400 μM) | | | |
|---------------------------|------------------------|------|------|------|-----------------------------------|------|------|------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 | 0 | 1 | 10 | 100 |
| Exp.1 | 4550 | 4450 | 4300 | 4200 | 2450 | 2750 | 3200 | 3650 |
| Exp.2 | 4700 | 4500 | 4450 | 4150 | 2250 | 2650 | 3350 | 3700 |

Cells were treated with ethanol (50 mM) or acetaldehyde (400 μM) for 48 hours in the presence of CGHJT (1-100 $\mu\text{g/ml}$) 4 hours before and DNA synthesis was measured by [^3H]thymidine incorporation assay (CPM).

동안 처리하여 DNA 합성을 [^3H]thymidine incorporation assay를 통하여 측정하였다.

에탄올을 처리하지 않은 세포의 경우에 약간의 감소 경향만 보였으나, 에탄올을 처리한 세포의 경우에는 검액의 농도에 비례하여 에탄올에 의해 억제된 DNA 합성이 현저히 회복되었다. 아세트알데히드를 투여한 경우에도 비슷한 결과를 보였다(Table 9).

3) 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 apoptosis에 미치는 영향 (Tryphan blue exclusion assay)

淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 apoptosis에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 에탄올과 아세트알데히드를 투여하기 4시간 전에 검액을 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여하고 에탄올(50mM)과 아세트알데히드(400 μM)로 각각 48시간 동안 처리하여 tryphan blue exclusion 분석을 시행하였다.

에탄올을 처리하지 않은 세포와 에탄올을 처리한 세포 모두 검액의 농도에 비례하여 현저한 apoptosis의 감소를 보였다. 특히 에탄올을 처리한 경우 검액 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여했을 때에 1/2 수준으로 감소하였다.

같은 방법으로 아세트알데히드를 투여한 세포와 투여하지 않은 세포를 각각 측정된 결과, 아세트알데히드를 처리하지 않았을 때와 처리했을 때 모두 검액의 농도에 비례하여 apoptosis의 감소를 보였다. 아세트알데히드로 처리하였을 때에도 역시 검액 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여하였을 경우에는 1/2 수준 이하로 감소하였다(Table 10).

4) 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 cytokine 발현에 미치는 영향 (RT-PCR analysis)

淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 cytokine 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 에탄올과 아세트알데히드를 투여하기 4시간 전에 검액을 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여하고 에탄올(50mM)과 아세트알데히드(400 μM)로 각각 48시간 동안 처리하여 RT-PCR을 통하여 분석하였다(Table 11).

에탄올에 의해 유발된 TNF- α 과 IL-1 β 의 증가된 발현량은 검액의 투여 농도에 비례하여 발현량이 감소하였으나 TGF- β 1, IL-6, IL-8은 약간 감소하거나 뚜렷한 변화를 보이지 않았으며, 아세트알데히드에 의

Table 10. Effect of CGHJT on Ethanol-induced and Acetaldehyde-induced Apoptosis

| CGHJT($\mu\text{g/ml}$) | Ethanol-untreated | | | | Ethanol (50 mM) | | | |
|---------------------------|-------------------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 | 0 | 1 | 10 | 100 |
| Exp.1 | 441 | 421 | 392 | 351 | 1268 | 1153 | 984 | 603 |
| | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 |
| Exp.2 | 426 | 419 | 396 | 344 | 1288 | 1109 | 942 | 612 |
| | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 |

| CGHJT($\mu\text{g/ml}$) | Acetaldehyde-untreated | | | | Acetaldehyde (400 μM) | | | |
|---------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 10 | 100 | 0 | 1 | 10 | 100 |
| Exp.1 | 441 | 421 | 392 | 351 | 1603 | 1421 | 1028 | 614 |
| | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 |
| Exp.2 | 426 | 419 | 396 | 344 | 1595 | 1309 | 975 | 574 |
| | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 | /2000 |

Cells were treated with ethanol (50 mM) or acetaldehyde (400 μM) for 48 hours in the presence of CGHJT (1-100 $\mu\text{g/ml}$) 4 hours before and apoptosis was measured by trypan blue exclusion assay. Values represent dead cells/total cells.

Table 11. Effect of CGHJT on Ethanol-induced and Acetaldehyde-induced mRNA Expression

| CGHJT ($\mu\text{g/ml}$) | Ethanol (50 mM) | | | | | Acetaldehyde (400 μM) | | | | |
|----------------------------|-----------------|------|------|------|------|-----------------------------------|------|------|------|------|
| | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| | 0 | 0 | 1 | 10 | 100 | 0 | 0 | 1 | 10 | 100 |
| TNF- α | 1.00 | 2.06 | 1.67 | 1.33 | 1.16 | 1.00 | 2.85 | 2.35 | 1.61 | 1.06 |
| TGF- β 1 | 1.00 | 2.05 | 1.97 | 1.89 | 1.90 | 1.00 | 3.17 | 3.01 | 2.95 | 2.91 |
| IL-1 β | 1.00 | 1.92 | 1.62 | 1.18 | 1.05 | 1.00 | 2.60 | 1.78 | 1.37 | 1.16 |
| IL-6 | 1.00 | 1.71 | 1.72 | 1.87 | 1.69 | 1.00 | 1.52 | 1.48 | 1.49 | 1.60 |
| IL-8 | 1.00 | 0.97 | 1.13 | 1.20 | 1.12 | 1.00 | 1.12 | 0.92 | 1.18 | 1.03 |

Cells were treated with ethanol (50 mM) or acetaldehyde (400 μM) for 48 hours in the presence of CGHJT 4 hours before and gene expression level (target/GAPDH) was examined using quantitative RT-PCR analysis. (-: CGHJT was not applied. +: CGHJT was applied.)

해 유발된 TNF- α 과 IL-1 β 의 증가된 발현량도 검액의 투여 농도에 비례하여 발현량이 감소하였으며 특히, 검액 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여하였을 경우에는 TNF- α , IL-1 β 는 1/2-1/3수준으로 감소하였다. TGF- β 1, IL-6, IL-8은 약간 감소하거나 뚜렷한 변화를 보이지 않았다 (Table 11).

고 찰

우리나라의 알코올 소비량은 생활양식의 변화와 사회 문화적 요인으로 점차 증가하고 있다¹⁾. 알코올에 의한 간질환은 만성간질환 중에 5-10% 정도를 차지한다고 추정되는데 최근 그 비율이 점점 높아지고 있다²⁾. 알코올성 간질환의 발생이 증가하고는 있지만 알코올로 인한 간손상 기전은 충분히 규명되어 있지 않아 알코올성 간질환의 치료약물 개발이 지연되고 있는데, 따라서 간손상 기전의 규명과 아울러 간독성

을 차단하는 약물의 개발이 시급한 실정이다. 최근에 한약물이 알코올 대사과정에 미치는 영향에 대한 연구가 보고되고 있으며¹⁰⁻¹³⁾, 알코올 대사에서 생기는 여러 대사물질과 손상된 간에 한약물이 미치는 영향에 대해서도 보고되고 있다⁷⁾. 그러나 한약물이 cytokine 발현 등 구체적인 간세포에 미치는 영향에 관한 연구는 미미한 실정이다. 酒傷에 임상적으로 다용되고 있는 약물 중 淸肝解酒湯은 알코올 대사과정에서 apoptosis 및 cytokine 발현 억제와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되며, 따라서 본 연구는 淸肝解酒湯의 알코올성 간손상에 대한 효과를 실험적으로 확인해 보고자 행하였다.

본 실험에 사용한 淸肝解酒湯은 주상에 대표적으로 활용되는 對金飲子에 砂仁을 넣고 茵陳四?散을 합방하여 葛根 赤楊을 加味한 처방이다. 對金飲子は 柳⁴⁾, 金¹⁵⁾ 등에 의해 알코올로 인한 간손상 회복에 효과가 있음이 보고된 바 있으며, 茵陳四?散에 대해서

는 禹⁶⁾, 李⁷⁾, 朴⁸⁾, 表⁹⁾, 金²⁰⁾이 흰쥐의 간손상에 대해 보호와 회복작용이 있음을 보고하였고, 表²¹⁾, 高²²⁾에 의해 HepG2 cell에 대하여 세포활성을 높이고, 유전자 조절을 통하여 apoptosis 및 세포손상을 억제한다고 보고된 바 있다. 葛根에 관한 연구로는 柳⁴⁾, 禹²³⁾, 金¹⁵⁾, 李²⁴⁾, 禹²⁵⁾ 등이 알코올 중독에 의해 유발된 흰쥐의 간손상에 유의성 있는 효과가 있음을 보고하였고, 葛根 성분중 daidzin이 ALDH를 선택적으로 억제하며, 또한 다른 성분인 daidzein과 genistein이 ADH를 억제한다고 하였다^{26,27)}. ADH의 활성을 억제하는 물질인 4-Methylpyrazole은 알코올에 의한 장기의 손상을 완화시키는 효과가 있다고 보고된 바 있는데²⁸⁾, 朴¹³⁾은 葛根이 ADH의 활성을 억제하여 상대적으로 ALDH의 혈중농도를 낮춤으로 간손상을 보호한다고 보고한 바 있다. 이밖에 국내에서도 葛根의 알코올 대사에 대한 연구가 다수 있었다^{10,12)}. 赤楊 또한 裴²⁹⁾, 洪³⁰⁾에 의해 알코올성 손상간의 개선효과와 혈중 알코올 농도의 증가를 유의성 있게 감소시키며, 실험적으로 유발된 쥐의 손상간에 대해 간보호 작용이 있음이 보고된 바 있다.

淸肝解酒湯에 대한 실험적 연구로 郭 등⁷⁾은 淸肝解酒湯이 알코올 대사과정에서 아세트알데히드의 생성을 억제하고, 알코올로 인하여 감소된 혈중 glucose를 회복시키고 증가된 triglyceride 및 BUN, 혈중 AST, ALT, ALP, LDH 및 uric acid를 유의성 있게 감소시켜 알코올에 의해 저하된 간기능을 회복시키는 작용이 있음을 보고하였으며, 李 등⁸⁾은 알코올성 지방간 환자에서 상승되어진 AST, ALT, GGT, TG 수치가 淸肝解酒湯의 투여 후 유의한 감소와 임상증상의 개선효과가 있음을 보고한 바 있다.

간질환 및 인체내 정상적인 생리기능 손상에 대한 최근의 연구경향은 점차 면역학적인 개념으로 관찰되고 있는데, 방법론적으로는 세포단위의 대사 및 apoptosis에 관여하는 단백질, DNA, RNA의 활성에 따라 발병원인과 변화과정을 물질대사의 상관관계로 판정할 수 있다는 가설³¹⁾에서 출발한다. 간세포의 염증과 관련된 cytokine 유전자인 TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8 등의 발현정도와 간손상 정도와는 상당

한 연관성이 있다고 알려져 있으며^{4,6)}, 모두 간조직의 감염이 시작 또는 진행되는 과정에서 그 발현이 증가한다. 각각의 cytokine이 간세포의 염증 및 손상에 미치는 분자적 영향은 다소 상이하지만 전반적으로 감염을 유발 또는 촉진한다고 이해되고 있다. TNF- α 를 비롯한 대부분의 cytokine은 세포조절기능을 가진 단백질군으로 면역과 염증반응의 강도와 기간을 조절하는 물질로 표적세포의 세포표면 수용기를 통하여 작용하며 작용기전은 호르몬과 유사하다.

알코올성 간염 환자는 혈액의 cytokine 즉 IL-1, IL-8 그리고 TNF- α 의 농도가 높아지며, 특히 IL-8과 TNF- α 는 예후와 관련을 보이는 것으로 알려져 있다. TNF- α 는 일차적으로 kuffer cell에서 유래하는 것으로 추측하고 있다. 간조직의 TNF- α mRNA의 양은 간세포의 괴사나 염증의 초기 변화와 관련성을 보인다. TNF- α 는 백혈구가 sinusoid endothelium에 adhesion 되는 것을 촉진하고, 세포내 활성산소를 유도하는 기능이 있으며, superoxide와 toxic proteinase의 분비를 자극하여 간손상을 가속화시킬 수 있어 염증과 치료효과의 혈청학적인 지표로 쓰이고 있다^{3,32,33)}. TGF- β 1은 간세포 증식과 세포의 기질 복구를 억제하는 작용이 있는 것으로 알려져 있으며 간 섬유화에 중요한 역할을 한다⁶⁾. 강력한 chemoattractant이며 neutrophil stimulator인 IL-8은 알콜성 간염환자의 간에서 발견되었으며 간의 IL-8은 neutrophil이 간실질로 이동하는데 관여한다³⁾. 쥐의 간세포와 kuffer cell을 장기간 알코올에 노출시키면 IL-8의 생산이 자극되지만, 그 기전은 알려져 있지 않다. IL-8의 유전자 발현은 oxidant stress와 TNF- α 에 의해 유도된다. IL-1 β 와 IL-6은 모든 활동성 간염과 연관되어 농도가 높아지는 것으로 보고되고 있다³⁴⁾.

염증은 간경변증 형성에 결정적인 역할을 하기 때문에 간질환의 항염증 치료(anti-inflammatory therapy)는 항상 관심이 되어 왔다. 특히 cytokine은 염증과 섬유화증에 관여하고 있어, 이 효과를 무력화시키는 cytokine항체, cytokine결합 억제제, cytokine생성 조절제 같은 anti-cytokine therapy가 주목을 받고 있다. 쥐를 대상으로 한 실험에서 cytokine항체는

cytokine의 효과를 불활성화시켜 간손상이 현저히 감소됨을 보여 치료약물의 가능성을 보여주고 있다²⁵⁾.

본 실험에서는 우선 HepG2 cell에서 에탄올과 중간대사물인 아세트알데히드에 의한 세포독성과 cell 증식, DNA 합성, apoptosis 및 cytokine 발현을 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 세포활성과 세포수 측정을 통해 에탄올과 아세트알데히드가 HepG2 cell에 세포독성을 일으켜 세포활성을 감소시키고 세포증식을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

에탄올과 아세트알데히드가 HepG2 cell의 DNA 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 [³H]thymidine incorporation assay를 시행하였으며, 이를 통해 에탄올과 아세트알데히드가 HepG2 cell의 DNA 합성을 감소시켰음을 알 수 있었고, 에탄올과 아세트알데히드에 의한 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 trypan blue exclusion assay를 시행하여, 에탄올과 아세트알데히드가 HepG2 cell에 세포독성을 일으켜 세포의 apoptosis를 증가시켰음을 알 수 있었다.

HepG2 cell에서 에탄올과 아세트알데히드가 cytokine 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 에탄올을 투여하고 48시간이 경과 후 TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8을 측정하였으며, 이를 통해 에탄올과 아세트알데히드가 HepG2 cell에서 농도 의존적으로 TNF- α , TGF- β 1과 IL-1 β 의 발현을 증가시켰음을 의미하며, IL-6과 IL-8의 발현은 에탄올과 아세트알데히드가 아닌 다른 인자에 영향받는 것으로 추정할 수 있었다.

이상과 같이 에탄올과 아세트알데히드가 세포독성을 일으킨 HepG2 cell에 淸肝解酒湯이 미치는 영향을 알아보기 위하여 다시 분석을 시행하였다.

淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 cytotoxicity에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서 淸肝解酒湯이 정상세포, 또는 에탄올과 아세트알데히드에 의해 억제된 세포활성을 농도 의존적으로 증가시킨다는 것을 알 수 있었고, 淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 세포증식 억제 및 DNA 합성에 미치는 영향을 분석하기 위해 시행한

실험에서는 淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드에 의해 억제된 DNA 합성을 증가시켜 감소되었던 세포증식을 크게 회복시키는 것을 알 수 있었다.

淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 apoptosis에 미치는 영향을 분석하기 위하여 시행한 실험에서는 淸肝解酒湯이 정상세포 또는 에탄올과 아세트알데히드에 의해 유발된 apoptosis를 감소시키는 것을 확인하였고, 淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 cytokine 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 시행한 실험에서는 淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 cytokine 발현 중에서도 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현에는 억제효과가 있으나, TGF- β 1, IL-6, IL-8에는 억제효과가 미약하거나 미치지 않았음을 관찰할 수 있었다.

이상에서 淸肝解酒湯이 에탄올과 아세트알데히드로 유발된 cytokine 발현에 미치는 영향을 분석한 결과, 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 억제된 간세포 활성을 증가시키고, 억제된 세포증식을 회복시켰으며, 증가된 apoptosis를 감소시키고, cytokine 유전자중 TNF- α , IL-1 β 의 발현을 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 淸肝解酒湯은 손상된 간세포에 독성작용을 억제하여 간세포를 보호하는 것을 확인 할 수 있었다. 향후 TNF- α , IL-1 β 의 발현 억제를 통한 간 보호작용의 기전에 대한 심층적인 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 에탄올과 아세트알데히드로 간세포 독성을 유발한 후 간세포의 활성도, 세포증식 억제, DNA 합성, apoptosis 및 cytokine 유전자 발현을 관찰하고, 淸肝解酒湯을 투여 후 호전반응을 보기 위하여, cytotoxicity, DNA 합성 및 증식억제, apoptosis, cytokine 유전자 발현을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 에탄올과 아세트알데히드는 HepG2 cell의 세포 활성을 감소시키고 세포증식을 억제하였으며,

DNA합성을 감소시키고 apoptosis를 증가시켰으며, cytokine 유전자인 TNF- α , TGF- β 1과 IL-1 β 의 발현을 증가시켰다.

2. 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 감소된 간세포의 활성을 증가시켰다.
3. 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 억제된 DNA 합성을 증가시켜 간세포 증식을 회복시켰다.
4. 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 증가된 apoptosis를 감소시켰다.
5. 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 증가된 TNF- α , IL-1 β 의 발현을 뚜렷하게 감소시켰으나, TGF- β 1, IL-6, IL-8의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 유발된 HepG2 cell의 감소된 세포활성과 세포증식을 증가시키고, apoptosis를 감소시키며, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시켜 간세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였다. 향후 TNF- α , IL-1 β 의 발현억제를 통한 간 보호효과의 기전에 관하여는 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 통계청. 한국의 사회지표. 1996:254-6.
2. 지선하, 서일, 김일순. 한국인 간질환의 변천. 서울:한국간협회. 1998:25-6,66,93.
3. 권상옥. 알콜성 간질환의 치료. 대한간학회지. 2001;7(suppl):71-8.
4. Shin EC, Choi YH, Kim JS, Kim SJ, Park JH. Expression patterns of cytokines and chemokines genes in human hepatoma cells. Yonsei Med J. 2002;43(5):657-64.
5. Mammaev SN, Lukina EA, Lugovskaia SA, Levina AA, Shul'pekova IuO, Pochtar' ME, Ivashkin VT. Cytokine production in patients with chronic viral hepatitis C during treatment with interferon-alpha. Klin Lab Diagn. 2001;8:45-8
6. Czaja MJ, Flanders KC, Biempica L, Klein C, Zern MA, Weiner FR. Expression of tumor necrosis factor-

alpha and transforming growth factor-beta 1 in acute liver injury. Growth Factors. 1989;1(3):219-26.

7. 광미애, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올대사 및 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(1):68-76.
8. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적연구. 대한한의학회지. 2001;22(4):107-13.
9. 경희의료원. 한약규격집. 서울:대성문화사. 1993;14-7,73-5,98-100,179,185-6,253-4.
10. 김명정, 김성곤, 박제민, 김지훈. 정상 성인에서 갈근이 혈중 알코올 농도에 미치는 영향. 부산정신의학. 1994;3:30-5.
11. 김명정, 정영인, 박제민, 김성곤, 최영길. 알코올 의존 환자에서 갈근이 혈중 알코올 농도와 음주 효과에 미치는 영향. 신경정신의학. 1996;35(6):1236-45.
12. 김지훈, 김명정, 김성곤, 박제민, 정영인. 정상 성인에서 갈근의 장기 투여가 혈중 알코올 농도에 미치는 영향. 신경정신의학. 1996;35(6):1230-1235.
13. 박형규, 이장훈, 우홍정. 酒傷에 활용되는 수종의 한약물이 알코올대사 및 간장해에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(3):186-93.
14. 류기원. 주상병에 응용되는 가미대금음자가 에탄올로 인한 백서의 간손상에 미치는 영향. 경희한의대는 문집. 1980;3:1-14.
15. 김영철, 우홍정, 김병운. 가미대금음자의 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대는문집. 1993;16:7-29.
16. 우홍정. 인진오령산과 인진 증량한 구성방이 흰쥐 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1992;13(1):234-41.
17. 이장훈. 간질환치료제의 효능에 관한 실험적 연구. 제 2회 한?중 학술대회 참가논문집-간장편.대한한의사협회. 1995;123-65.
18. 박형규, 김동우, 이장훈, 우홍정, 김병운. 인진사령산이 급성 Alcohol, 고지방식 및 Galactosamine 중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1993;14(2):254-69.
19. 표임정, 이장훈, 우홍정, 김병운. 인진오령산이 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995;16(2):281-98.
20. 김우환. 인진오령산의 백서 간병변에 대한 보호 및 회복작용. 원광대학교대학원. 1988.
21. 표임정, 이장훈, 우홍정. 인진사령산이 간세포활성, 세포주기 및 FAS-mediated Apoptosis 에 미치는 영향.

- 경희대학의대논문집. 1999;22(1):119-40.
22. 고흥, 이장훈, 우홍정. 인진사령산분획물이 간세포활성, 세포주기 및 FAS-mediated Apoptosis 에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(3):174-85.
23. 우홍정. 갈화해성탕이 에탄올 중독 흰쥐의 간기능에 미치는 영향. 경희대학의대논문집. 1984;7:87-104.
24. 이장훈, 김영철, 우홍정. Clinical Study on 133 Cases of Temperance (Quit Drinking) Therapy. Journal of Oriental Medicine. 1998;3(1):59-69.
25. 우홍정, 이장훈, 김영철. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol 중독 및 CCl4 중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):411-29.
26. Keung WM, Vallee BL. Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian golden hamsters. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:21.
27. Keung WM, Vallee BL. Daidzin A potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:4.
28. Iaquinto G, Tacca MD, Cuccurullo L, Parodi MC, Giardullo N, D' onofrio V, Natale G, Carignani D, Ferraraccio F, Szabo S. Gastroprotection by 4-methylpyrazole against ethanol in humans. Dig Dis Sci. 1998;43(4):816-25.
29. 배현수. 赤楊의 독성 및 간장해에 미치는 영향. 동양의학. 1991;17(3):16-21.
30. 홍미숙. 적양생간탕이 알코올성 간손상에 미치는 효과. 경희대학교 논문집. 1992;15:169-201.
31. 김창민. 아포토시스와 간질환. The Korean Journal of Hepatology. 1996;2(2):96-103.
32. Goossens V, De Vos K, Vercammen D, Steemans M, Vancompernelle K, Fiers W, Vandenabeele P, Grooten J. Redox regulation of TNF signaling. Biofactors. 1999;10:145-156.
33. Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:8115-9.
34. Spanakis NE, Garinis GA, Alexopoulos EC, Patrinos GP, Menounos PG, Sklavounou A, Manolis EN, Gorgoulis VG, Valis D. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. J Clin Lab Anal. 2002;16(1):40-6.
35. Imuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thruman RG. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. Hepatology. 1997;26:1530-7.