

원저

茵陳과 茵陳四苓散加減方이 肝細胞活性,
細胞週期 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 影響

姜禹聲*, 李長勳*, 禹弘楨*

ABSTRACT

The Effect of Injin and Injinsaryongsangagambang on Liver Cell Viability,
Liver Cell Cycle Progression and DNA Damage-induced Apoptosis

Woo-Sung Kang*, Jang-Hoon Lee* and Hong-Jung Woo*

* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

The effects of Yinjin and Yinjinsaryongsangagambang on a DNA damaging agent, etoposide-induced apoptosis, cell viability, cell cycle progression, and mRNA expression of apoptosis-related genes of human hepatocyte cell line HepG2 were investigated using tryphan blue exclusion assay, MTT assay, flow cytometry, immunocytometric analysis of PCNA, and quantitative RT-PCR analysis.

MTT assay showed that Yinjin and Yinjinsaryongsangagambang increases cellular viability of HepG2 cells in a dosage-dependent manner. Stimulation of cell cycle progression by Yinjin or Yinjinsaryongsangagambang was detected by flow cytometric analysis of the DNA content and immunocytometric analysis of PCNA expression. A significant reduction of a DNA-damaging agent, etoposide-induced apoptosis were found in both Yinjin and Yinjinsaryongsangagambang-treated cells in dosage-dependent manner.

In overall, 3-fold reduction of apoptosis was recognized in 10.0 $\mu\text{g/ml}$ of Yinjin or Yinjinsaryongsangagambang-treated cells compared to untreated cells. Although the difference is not significant, Yinjinsaryongsangagambang showed slightly higher effect on the inhibition of apoptosis than Yinjin.

From flow cytometric analysis of apoptosis, while 39.9% of untreated cells showed etoposide-induced apoptotic cell death, only 19.6% or 17.4% of Yinjin or Yinjinsaryongsangagambang-treated cells were found at apoptotic sub G1 phase, respectively. Interestingly, strong induction of Gadd45-mRNA was observed from Yinjin or Yinjinsaryongsangagambang-treated cells. However, no changes in expression levels of p53 and Waf1 were detected, demonstrating that induction of Gadd45 mRNA expression by Yinjin or Yinjinsaryongsangagambang occurs by p53-independent mechanism. Marked mRNA inductions of two apoptosis-inhibiting genes, Bcl-2 and Bcl-XL, were found in both Yinjin or Yinjinsaryongsangagambang-treated HepG2 cells while no changes was detected in expression levels of an apoptosis-promoting gene, Bax.

Key Words: Injin, Injinsaryongsangagambang, Apoptosis, MTT assay, Flowcytometry, RT-PCR, Genes(Gadd45, p53, Waf1, Bcl-2, Bcl-XL, Bax)

I. 서 론

우리나라는 바이러스성肝炎의罹患率이 상당히 높고, 특히 B형肝炎 保菌者는 전 국민의 7~10%에 이르고 있으며 이로 인한 急慢性肝炎, 肝硬變症 및 肝癌의 發病率이 매우 높은 實情이다. 統計廳 資料에 의하면 肝疾患으로 인한 死亡이 5代死因으로 發表되고 있고, 특히 肝癌으로 인한 死亡率은 인구 10만명당 21.4명으로 世界保健統計年鑑에 발표된 나라 중 가장 높은 것으로 나타났다¹⁾. 따라서 우리나라에서 만연되고 있는 肝臟疾患은 國民健康의 측면에서 시급히 解決해야 할 社會的 問題가 되고 있다.

1972년 Kerr 등에 의해 定立된 apoptosis가 암, 바이러스성 질환, AIDS 등 광범위한 疾病에서 중요한 역할을 擔當하는 것으로 밝혀졌다. 肝炎바이러스에 의한 肝細胞損傷에 있어서도 apoptosis는 肝細胞의 增殖, 再生, 肝肥大, 肝萎縮 및 肝癌의 病理過程 등에 관계된다²⁾. Apoptosis는 여러 가지 遺傳子 産物에 의해 調節되며 열, stress, virus 등 다양한 原因과 條件에서의 apoptosis 現象에 대한 分子生物學的 分析과 臨床樣相과의 相互 關聯性에 대한 研究가 지속되고 있다^{3,4)}.

韓醫學에서 肝疾患에 대한 內容은 文獻上 주로 黃疸, 脹滿, 積聚 등에서 살펴볼 수 있는데, 특히 바이러스성 肝疾患과 관련해서는 주로 黃疸門에 자세히 기술되어 있다. 黃疸의 주된 原因은 濕熱熏蒸, 寒濕在裏 등이며, 治法으로는 清熱利濕이 根幹이 되고, 代表的인 治療處方으로는 茵陳五苓散^{5,6)}이 있다.

本 實驗에 使用된 藥物은 張仲景이 濕熱黃疸의 治療를 目的으로 使用한 茵陳五苓散에서 主藥인 茵陳과 茵陳五苓散에서 肉桂를 除한 茵陳四苓散의 藥物中 茵陳, 白朮, 茯苓의 3種類의 韓藥材를 混合處方한 것을 使用하였으며, 이들 藥物들은 現在 臨床에서 慢性肝疾患의 治療에 清熱利濕 退黃의 要藥으로 많이 活用되고 있다.

이들 藥物을 主材로한 研究로 金⁷⁾은 茵陳을 主材로한 生肝健脾湯으로 臨床報告와 함께 生化學的, 電子顯微鏡下的 組織細胞學的

觀察을 通하여 肝臟의 代謝와 再生機能에 有意性 있는 效果가 있음을 報告하였다. 또한 禹⁸⁾는 茵陳의 增量에 따른 肝疾患治療效果의 有意性을 實驗을 通하여 檢證하였으며, 李⁹⁾는 茵陳을 主材로 한 數種의 處方이 實驗的인 肝損傷에 대해 肝保護作用과 利膽作用 및 脂質 降下作用등의 效能이 있음을 報告하였고, 朴¹⁰⁾은 茵陳四苓散이 急性 alcohol, 高脂肪食 및 galactosamine中毒 白鼠의 損傷肝에 대한 研究에서 肝機能改善 및 損傷된 肝의 恢復에 有意한 效果가 있다고 報告하였다. 또한 洪¹¹⁾은 茵陳을 主材로 한 藥物이 肝細胞의 活性을 높이고, 細胞週期 및 apoptosis에 關여하는 遺傳子의 발현을 통해 細胞의 損傷을 抑制하는 肝保護 效能을 報告하였다.

이와 같이 茵陳과 茵陳을 主材로한 藥物의 效能에 關한 臨床的, 實驗的인 研究는 繼續되어 왔으나 cell cycle, apoptosis 등의 分子生物學的인 接近이나 遺傳子의 發現과 韓藥과의 關係를 究明하려는 試圖는 아직도 微微한 實情이다.

이에 著者는 本 研究에서 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 DNA손상으로 유발된 肝細胞의 apoptosis에 미치는 影響을 分子生物學的인 方法으로 檢證하고자 HepG2 細胞 活性의 增加度를 MTT assay로 測定하였고, HepG2 細胞의 細胞週期에 대한 刺戟을 알아보기 위하여 flow cytometry와 細胞週期 活性遺傳子인 PCNA 發現度를 測定하였다. 또한 DNA를 損傷시키는 物質인 etoposide로 유발된 HepG2 細胞의 apoptosis 抑制 程度를 알아보기 위하여 tryphan blue exclusion과 flow cytometry를 통해 分析하였으며, apoptosis 關聯 遺傳子의 定量的 RT-PCR 分析으로 損傷된 DNA回復에 決定的인 役割을 하는 Gadd45 遺傳子와 Bcl-2類 遺傳子의 發現을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 材 料
- 1) 藥 材

本實驗에 使用한 茵陳과 茵陳四苓散加減方은 韓藥規格集에 根據하여 慶熙醫院 韓方病院 藥劑室에서 嚴選한 것을 購入하여 使用하였으며 處方의 內容은 다음과 같다.

Composition of Yinjin and Yinjinsaryongsan-gagambang

	構成藥物	用量	生藥名 / 學名
茵陳	茵陳	30g	Artemisiae Capillaris Herba/Artemisia capillaris Turcz.
	茵陳	30g	Artemisiae Capillaris Herba/Artemisia capillaris Turcz.
茵陳四苓散加減方	白朮	12g	Atractylodes Rhizoma Alba/Atractylodes macrocephala Kuntz.
	茯苓	12g	Fuelen /Poria cocos(Sims) Wolf

2) 檢液의 調製

實驗에 使用한 檢液의 調製는 1貼 分量인 試料 20g과 54g을 3次蒸溜水 2ℓ로 2時間 동안 2回 還流抽出한 後 綿으로 濾過하여 그 濾液을 80℃물 중탕위에서 減壓 濃縮하고, 凍結乾燥器(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 利用하여 각각 5.5g(收率:27.5%)과 17.5g(收率:32.4%)의 乾燥抽出物을 얻었다.

2. 方法

1) 肝細胞의 培養

사람 간암 세포주인 HepG2는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였으며 10% fetal bovine serum이 첨가된 DMEM(Gibco)으로 배양하였다. 細胞는 5% CO2의 가습된 공기와 37℃의 온도에서 배양하였다.

2) 肝細胞에 대한 藥物處理

茵陳과 茵陳四苓散加減方은 0.1, 1, 10μg/ml의 농도로 HepG2細胞가 50-60%의 密度로 자랐을 때, 24-72시간동안 處理하였다. Apoptosis, 細胞증식, 遺傳子 發現의 分析을 위해서 trypsin-EDTA로 細胞를 모았다. 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 DNA損傷으로 誘發된 apoptosis에 미치는 影響을 分析하기 위하여 HepG2細胞에 DNA 損傷 物質인 etoposide를 20 μmol/ml의 濃度로 6시간 동안 處理한 後 茵陳과 茵陳四苓散加減方을 處理하였다.

III. 실험

1. MTT 反應實驗

1) MTT 溶液製作 및 處理

MTT 5mg/ml을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 後 0.22μm의 filter로 濾過하여 stock solution을 만들었다. 그 後 1×104개의 細胞를 包含하고 있는 100 μℓ의 cell suspension에 10μℓ의 MTT stock solution을 添加하였다.

2) 酵素反應과 免疫螢光測定

MTT stock solution에 cell suspension을 添加한 狀態로 37℃에서 3時間 保存한 後 100μℓ의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 各各의 well에 넣고 잘 混合하여 blue formazan crystals을 完全히 溶解시켰다. 酵素의 溶解가 끝난 뒤 570nm에서 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 측정기로 OD(optical density)를 測定하였다.

2. Cell cycle analysis

細胞를 PBS로 2回 洗滌한 後 70% 차가운 ethanol에서 1時間 동안 4℃에서 고정하였다. 다시 100μg/ml propidium iodide와 1mg/ml RNase가 포함된 1.5ml PBS에서 재현탁하였다. 37℃에서 2時間 동안 培養한 후 세포를 回數하여 PBS에서 재현탁하여 FACS Caliber Cellquest program (Becton Dickinson)을 利用하여 分析하였다.

3. PCNA exepression analysis

細胞增殖의 標識者인 PCNA expression을 immunocytoemetry를 이용하여 측정하였다. 1X107개의 細胞를 PBS로 2回 洗滌한 後 여기에 0.1% fetal bovine serum이 含有된 PBS 100ml를 添加하였다. 細胞를 30分間 70% ethanol에 고정하고 PBS로 2回 다시 세척한 후 immunocytoemetry를 이용하여 PCNA의 量을 測定하였다.

4. Apoptosis 觀察

1) Tryphan blue exclusion에 의한 分析

현미경을 利用한 apoptosis 分析을 위하여 細胞를 수집한 후 차가운 PBS로 ml당 5X105

개가 되도록 suspension한다. 수집된 세포 0.5ml를 slide에 준비하여 trypan blue로 염색하여 죽은 細胞의 數를 현미경으로 측정하였다.

2) Flow cytometry에 의한 分析

細胞를 PBS로 2回 洗滌한 後 70% cold ethanol에서 1時間 동안 4°C에서 고정하였다. 다시 10 μ g/ml propidium iodide와 1mg/ml RNase가 포함된 1.5ml PBS에서 재현탁하였다. 37°C에서 2時間 동안 培養한 後 세포를 回數하여 PBS에서 재현탁하여 FACS caliber cellquest program(Becton Dickinson)을 利用하여 分析하였다.

5. 定量 RT-PCR

(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

1) RNA의 抽出

① GSS solution의 製作

250g의 guanidine isothiocyanate을 293ml의 3次 蒸溜水에 넣은 後 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 넣어 65°C에서 stirring한 後 filtering하여 滅菌하였다.

② Solution D의 製作

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 濃度로 넣어 製作하였다.

③ 10⁷개의 細胞에 solution D 500 μ l, 2M sodium acetate, pH 4.0 50 μ l 를 넣어 잘 混合한 後 water-saturated phenol 500 μ l, chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 100 μ l를 넣어 10秒間 vortexing하여 ice에 15分間 放置하였다.

④ 混合溶液을 15000rpm에서 20分間 遠心分離하여 上清液의 4/5를 回收하여 同量의 cold isopropanol 1000 μ l를 넣어 -70°C에서 24時間 沈澱시켰다.

⑤ 15000rpm에서 20分間 遠心分離하여 溶液을 除去한 後 RNA pellet을 100% ethanol과 70% ethanol로 洗滌한 後 30 μ l의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 利用하여 RoNA의 量을 測定하였다.

2) cDNA의 製作

MoMuLV(Moloney murine leukemia virus)-역전사효소(Gibco)와 random hexamer primer를 이용하여 20 μ l 반응으로 1 μ g RNA를 cDNA로 역전사한다. 즉, 1 μ g RNA에 2 μ l 역전사효소 buffer, 1 μ l random hexamer(10pM), 1 μ l MoMuLV-역전사효소(10U/ μ l) 그리고 0.5 μ l RNase 억제물질을 섞어서 23°C에서 15초, 42°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 반응시킨다. 각각의 RNA로부터 두 개의 cDNA를 별도로 제작하고 멸균된 증류수로 1:4 또는

Table 1.

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

Gene	Primer	Sequences	Orientation
<i>GAPDH</i>	2	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	sense
	3	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
<i>Gadd45</i>	GD1	GTGAGTGAGTGCAGAAAGCAGGCG	sense
	GD3	GAAGTGGATCTGCAGAGCCACATC	antisense
<i>p53</i>	5789	TCTGTCCCTTCCCAGAAAACC	sense
	6930	TTGGGCAGTGCTCGCTTAGTGCTCC	antisense
<i>Waf1</i>	SC05	AGCTGGGCGCGGATTCGCCGAG	sense
	SC04	AGGCTTCCTGTGAGCGGGCCTTTG	antisense
<i>Bcl-2</i>	PM12	CTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTG	sense
	PM14	TGACTTCACTTGTGGCCCAGATAG	antisense
<i>Bcl-X_L</i>	1	GTGAGTGACGGTCAGTG	sense
	2	TTGGACAATGGACTGGTTGA	antisense
<i>Bax</i>	B3	GTGGCAGCTGACATGTTTTTC	sense
	B4	AGCTGGGGCCTCAGCCCATC	antisense

1:8로 희석한다.

3) Primer의 製作 및 quantitative PCR

遺傳子 發現을 定量的으로 分析하기 爲하여 먼저 cycle 數를 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 cycle로 增加시키면서 cDNA를 1:0, 1:2, 1:4, 1:8로 희석하여 PCR을 시행하였다. 각각의 주기는 95℃에서 1분간의 변성, 58-62℃에서 45초간의 annealing, 72℃에서 1분간의 DNA 연장 등으로 구성되어 있다. 이 실험은, housekeeping standard인 GAPDH를 포함한 모든 유전자에 대해서 50 μ l RCR reaction속의 12.5-25 ng cDNA가 26-34 cycle을 거치면서 로그함수적 증가를 보여주고 있다. RT-PCR 산물은 2% agarose gel에서 110V, 1시간동안 분리하였다. Gel은 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)의 1X TBE로 30분간 염색한 후, 1X TBE로 15분간 탈색했다. 자외선을 이용하여 관찰하고 사진으로 기록했다. 사진으로 음성인 것들은 깨끗해질 때까지 증류수에 흡수시키고 공기 중에서 말린다. 올리고핵산 시발체와 그 서열은 Table.1에 명시되어 있다. 3'과 5'의 시발체는 적어도 하나의 intron에 의해 분리된 서로 다른 exon에 위치하는데 이것은 잘린 mRNA PCR 산물을 잘라지지 않은 mRNA의 PCR 산물과 변별하기 위한 것이다. 각 증폭된 遺傳子에 대한 RT-PCR의 특이도는 올리고핵산을 biotinylate시키고 chemiluminescence감지를 이용한 southern blot 분석을 통해 확인하였다. 遺傳子 발현 정도의 정량은 레이저 밀도분석기로 ethidium bromide 염색된 agarose gel을 scan하여 실시하였다. 배경을 잡고 housekeeping gene, GAPDH 각각의 curve의 영역의 비율은 정량적으로 遺傳子 발현과 관련되어 있다. 전술한 정량적 RT-PCR은 같은 cDNA에 대하여 두 번 이상 실시하였다.

IV. 성 적

1. MTT 反應實驗

茵陳(以下 Sample1)과 茵陳四苓散加減方(以下 Sample2)이 세포활성도에 미치는 효과를 조사하기 위하여 HepG2 cell에 Sample1과

Sample2를 각각 0.1, 1.0, 10.0 μ g/ml의 濃度별로 48시간 동안 處理한 후 細胞의 活性度를 MTT assay를 利用하여 分析하였다. 그 결과 Sample1과 Sample2에서 濃도의존적으로 세포활성이 증가되었으며, Sample1과 Sample2 사이에는 유의한 차이가 없었다(Table 2).

Table 2.

Effects of Sample1 and Sample2 on the Cellular Viability of HepG2

μ g/ml	Sample1		Sample2	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
Control	0.211	0.230	0.211	0.230
0.1	0.239	0.247	0.241	0.254
1.0	0.268	0.279	0.259	0.273
10.0	0.297	0.298	0.293	0.291

2. Cell cycle analysis

細胞를 10 μ g/ml의 濃度로 각각 Sample1과 Sample2를 48시간 處理한 후 세포주기를 flow cytometry를 利用하여 分析한 결과 細胞分裂週期の 增加를 확인할 수 있었다. G1 期의 비율을 比較하면 대조군의 68.3%에 비하여 처리군은 각각 47.3%과 44.8%로 감소되었다. 이 결과는 HepG2 細胞의 細胞分裂을 Sample1과 Sample2가 強力하게 誘導하고 있음을 나타낸다(Fig. 1).

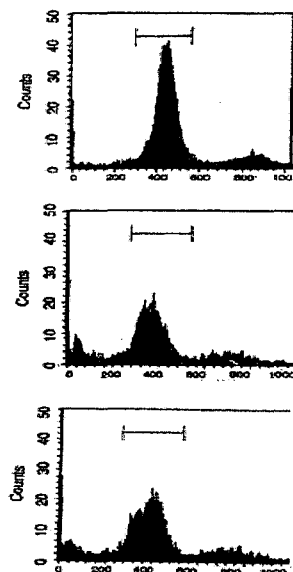


Fig. 1.

Flow cytometric analysis of the effect of Sample1 and Sample2 on the cell cycle progression of HepG2 cells.

(C: untreated control cells, 1: Sample1-treated cells, 2: Sample2-treated cells)

3. PCNA expression analysis

Sample1과 Sample2가 HepG2 細胞의 增殖에 미치는 影響을 評價하기 위해 細胞들을 0.1, 1.0, 10.0µg/ml 濃度の Sample1과 Sample2로 各々 24, 48, 72시간 동안 處理한 후 세포주기의 G1期에서 S期로 轉移될 때 증가되는 것으로 알려진 PCNA를 immunocytoetry를 이용하여 分析하였다.

Table. 3에서 보는 것과 같이 Sample1과 Sample2를 處理한 모든 群에서 PCNA 發現의 有意한 增加가 觀察되었다. 이 結果는 이전의 flow cytometry를 통한 分析과 一致하는 것으로 PCNA의 發現 增加는 濃도와 時間에 比例하여 나타났다. 72시간 처리군의 경우 대조군에서 PCNA 수준이 59.9였던 반면, 0.1, 1.0, 10.0µg/ml의 濃度別로 Sample1을 處理한 群에선 各々 69.2, 74.8, 81.4였고, Sample2를 處理한 群에서는 各々 70.7, 79.4, 86.2의 PCNA가 검출되었다. 따라서 세포주기의 G1期에서 S期로의 轉移에 影響을 미치는 PCNA의 뚜렷한 상승은 Sample1과 Sample2의 濃度依存的으로 나타났으며 Sample1에 비해 Sample2에서 약간 더 높은 效果를 나타내었다.

Table 3.

Immunocytoetric Analysis of PCNA Expression in Sample1 and Sample2 Treated HepG2 Cells

µg/ml	hrs	Control	0.1	1.0	10.0
Sample1	24	60.1	61.4	69.1	69.9
Sample2		60.1	62.7	72.4	75.1
Sample1	48	57.4	65.1	69.3	73.0
Sample2		57.4	65.9	72.9	78.0
Sample1	72	59.9	69.2	74.8	81.4
Sample2		59.9	70.7	79.4	86.2

4. Apoptosis의 分析

細胞 損傷, 특히 사람 肝細胞의 DNA 損傷

으로 誘發된 apoptosis에 Sample1과 Sample2가 미치는 影響을 究明하기 위해 DNA 損傷物質인 化學요법제로 etoposide를 處理하여 apoptosis를 誘發하였다. HepG2 細胞를 20 µ moles/ml의 etoposide로 6시간 동안 處理한 후 0.1, 1.0, 10.0µg/ml의 Sample1과 Sample2로 48시간 동안 處理하였다. Apoptosis는 tryphan blue exclusion assay와 sub G1期の flow cytometry로 분석하였다.

1) Tryphan blue exclusion에 의한 分析

HepG2 細胞가 50-60%의 密度로 자랐을 때, etoposide를 20 µ mol/ml의 濃度로 6시간 동안 處理하고 난 다음, Sample1과 Sample2는 10µg/ml의 濃度로 48시간동안 處理하였다. 細胞들을 收集하고 tryphan blue로 染色하여 apoptosis에 빠진 細胞의 數를 顯微鏡 檢査로 測定하였다. Table 4에서와 같이, Sample1과 Sample2 處理群에서 apoptosis에 빠진 細胞數의 有意한 減少가 觀察되었으며 이것은 用量依存的으로 나타났다. Etoposide 處理 HepG2 細胞群의 54.0%가 apoptosis에 빠진 반면, 0.1, 1.0, 10.0µg/ml의 濃度로 Sample1處理群에선 各々 49.3%, 33.9%, 19.2%였고 Sample2 處理群에선 各々 47.8, 30.1, 17.0%의 apoptotic cells이 發見되었다. 따라서 10 µg/ml Sample1과 Sample2에서 약 3배 가량의 apoptosis 減少가 觀察되었다. Sample1과 Sample2와의 차이가 有意하지 않을지라도 두 번의 實驗에서 Sample1보다 Sample2가 약간 더 높은 抑制 效果가 觀察되었다(Table 4).

Table 4.

Tryphan Blue Exclusion Analysis of an Inhibition of Etoposide Induced Apoptotic Cell Death by Sample1 and Sample2(dead cells/total cells)

µg/ml		Control	0.1	1.0	10.0
Sample1	Exp.1	1011/2000	998/2000	656/2000	45/2000
	Exp.2	1148/2000	973/2000	698/2000	421/2000
	Mean	1080/2000 (54.0%)	986/2000 (49.3%)	677/2000 (33.9%)	383/2000 (19.2%)
Sample2	Exp.1	1011/2000	948/2000	590/2000	310/2000
	Exp.2	1148/2000	962/2000	612/2000	369/2000
	Mean	1080/2000 (54.0%)	955/2000 (47.8%)	601/2000 (30.1%)	340/2000 (17.0%)

2) Flow cytometry에 의한 분석

Apoptosis의 과정에서 세포는 작은 DNA분절을 포함하는 소결절로 분산되는데 이를 apoptotic body라고 한다. Apoptotic body의 DNA 함량은 정상 세포주기의 G1期 細胞의 DNA含量인 2n 미만이므로 이들은 sub G1期로 分類되며 DNA含量으로 分析하는 flow cytometry에 의해 檢出될 수 있다. HepG2 細胞가 50-60%의 密度로 자랐을 때, etoposide를 20 μmol/ml의 濃度로 6시간 동안 處理하고 난 다음, Sample1과 Sample2는 10 μg/ml의 濃度로 48시간동안 處理하였다. Fig.2에서 보여지듯이 Sample1과 Sample2處理群에서 apoptosis 단계라고 불리어지는 sub G1期の 有意한 減少가 있었다. 즉, 대조군의 apoptosis 細胞들이 39.9%인 반면에 Sample1과 Sample2處理群은 각각 19.6%, 17.4%로 나타났다.

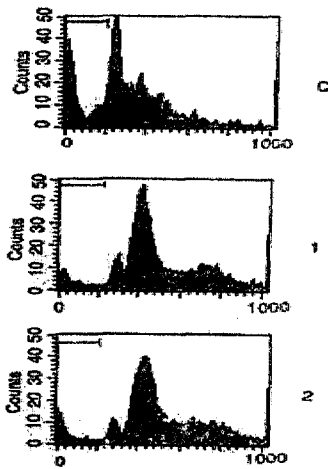


Fig. 2.

Flow cytometric analysis of the effects of Sample1 and Sample2 on etoposide induced apoptosis of HepG2 cells.(C: untreated control cells, 1: Sample1-treated cells, 2: Sample2-treated cells)

5. Quantitative RT-PCR(Reverse Transcription) analysis

1) Expression of Gadd 45 mRNA

Sample1과 Sample2에 의한 HepG2 細胞의

etoposide 誘發 apoptosis 抑制는 Sample1과 Sample2가 DNA損傷 回復 效果를 가짐을 暗示한다. DNA 重合酵素 δ의 cofactor로 作用하여 損傷된 DNA 回復에 決定的인 役割을 하는 Gadd45 遺傳子의 發現을 檢査하기 위하여 Sample1과 Sample2處理 細胞의 RNA를 抽出하여 定量的 RT-PCR을 實施하였다. HepG2 細胞에 etoposide를 20 μmol/ml의 濃度로 6시간 동안 處理하고 난 다음, Sample1과 Sample2는 0.1, 1.0, 10.0 μg/ml의 濃度로 24시간동안 處理하였다. 이렇게 處理된 細胞의 Gadd45 mRNA 發現의 水準을 대조군과 比較한 결과 Sample1과 Sample2處理群 모두에서 Gadd45 mRNA 發現의 有意한 增加가 觀察되었다(Fig. 3). 이 結果를 確認하기 위하여 두 번의 實驗을 反復하였고 같은 結果를 얻었다. 그러므로 이 結果는 Sample1과 Sample2에 의해 etoposide로 誘發된 apoptosis의 抑制가 部分的으로 Gadd45 遺傳子의 轉寫의 發現의 誘導에 의한 것임을 强하게 시사한다. Table 5에 나타난 바와 같이 Gadd45 mRNA 發現의 相對的 水準은 대조군, 0.1, 1.0, 10.0 μg/ml Sample1處理群에서 각각 1.00, 1.76, 2.23, 3.67이었고, 대조군, 0.1, 1.0, 10.0 μg/ml Sample2處理群에서 각각 1.00, 1.69, 2.37, 3.71이었다.

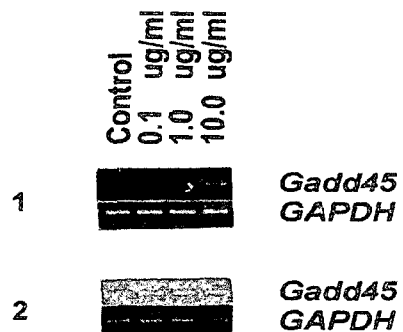


Fig. 3.

Quantitative RT-PCR analysis of Gadd45 mRNA expression.(C: untreated control cells, 1: Sample1-treated cells, 2: Sample2-treated cells)

2) Gadd 45 mRNA 發現에 있어 P53과의 關聯性

Sample1과 Sample2가 Gadd45 mRNA의 發現을 誘導한다는 사실은 癌 抑制 遺傳子이자 強力한 Gadd45의 發現 誘導 遺傳子인 p53이 關與한다는 것을 暗示한다. 이 假說을 檢證하기 위하여 Sample1과 Sample2를 處理한後 p53과 그것의 信號 증개자인 Waf1 mRNA의 發現 程度를 定量的 RT-PCR로 測定한 결과 p53과 Waf1의 變化는 感知되지 않았다(Fig. 4). 따라서 본 연구에서는 Sample1과 Sample2의 Gadd45 mRNA 발현 유도에 p53이 직접 關聯되지 않는 것으로 관찰되었다.

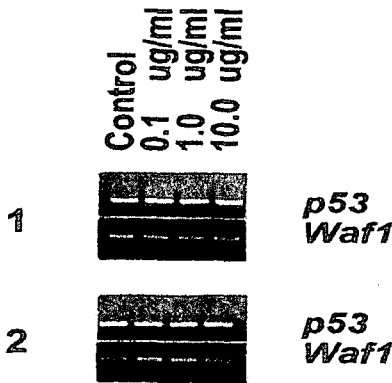


Fig. 4.

Quantitative RT-PCR analysis of the p53 and Waf1 gene(C: untreated control cells, 1: Sample1-treated cells, 2: Sample2-treated cells)

3) Expression of the Bcl-2 family genes

최근 研究들은 p53, Fas, TNF- α 를 包含하는 다양한 경로 的 細胞內 apoptosis 信號가 Bcl-2, Bcl-XL, Bax와 같은 Bcl-2類 遺傳子에 의해 媒介된다고 報告하고 있다. Fig.5에서 보여지듯이 Sample1과 Sample2를 投與하면 apoptosis 促進 遺傳子인 Bax에는 變化가 없는 反面에 apoptosis 抑制 遺傳子인 Bcl-2, Bcl-XL은 濃度依存的으로 增加시키고 있다. 10.0 μ g/ml Sample1과 Sample2處理 HepG2 細胞에서 Bcl-2, Bcl-XL이 약 2배정도 增加되

었다(Table 5). 이 結果는 Sample1과 Sample2가 Bcl-2類 遺傳子의 轉寫의 發現을 誘導하며 이를 通하여 apoptosis를 抑制하고, 이것은 細胞 內外의 apoptosis 促進 信號로부터 肝細胞를 保護하는데 寄與한다고 할 수 있다.

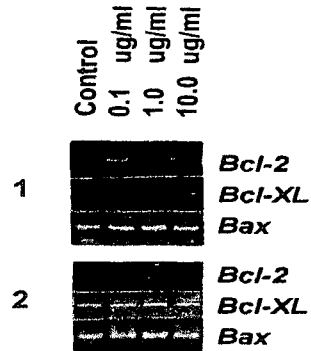


Fig. 5.

Quantitative RT-PCR analysis of the Bcl-2 family genes.(C: untreated control cells, 1: Sample1-treated cells, 2: Sample2-treated cells)

Table 5.

Quantitative RT-PCR Analysis of Apoptosis-related Gene Expression in Sample1 and Sample2 -treated HepG2 Cells

μ g/ml		Control	0.1	1.0	10.0
Gadd45	Sample1	1.00	1.76	2.23	3.67
	Sample2	1.00	1.69	2.37	3.71
p53	Sample1	1.00	1.04	1.13	0.93
	Sample2	1.00	0.91	1.07	0.98
Waf1	Sample1	1.00	1.16	0.92	1.09
	Sample2	1.00	0.89	1.01	0.96
Bcl-2	Sample1	1.00	1.21	1.58	1.97
	Sample2	1.00	1.26	1.67	1.91
Bcl-XL	Sample1	1.00	1.36	1.73	2.07
	Sample2	1.00	1.49	1.77	1.99
Bax	Sample1	1.00	1.06	0.93	1.12
	Sample2	1.00	0.93	1.13	0.95

V. 고 찰

韓醫學에서 肝疾患에 대한 內容은 黃疸, 脇痛, 積聚, 鼓脹, 酒傷, 勞倦傷 등의 證候에 수록되어 있다. 이 중 黃疸의 證候는 바이러스성 肝疾患의 주된 容이 記述되어 있다. 黃帝內經에서 “溺黃赤 安臥者 黃疸, 目黃者 黃疸”이라 하였으며¹²⁾ A.D. 200년경에 張仲景은 黃疸의 다양한 증후를 관찰하였고, 黃疸의 程度나 體液의 狀態 또는 小便狀態 등에 따라 豫後를 判定했으며, 그 治療에 있어서도 茵陳五苓散 등 다양한 處方을 제시하였다.^{2,3)} 이후 歷代醫家들에 의해 黃疸에 대한 研究가 進行되어 왔으며, 근래에는 virus性 肝疾患에 대한 研究가 계속 報告되고 있다.

우리나라의 경우 간염 바이러스(특히 B형)에 의한 慢性肝疾患의 罹患率이 세계적으로 높은 편이고, 社會적으로 중요한 역할을 담당할 40대에서 肝疾患으로 인한 死亡率이 가장 높게 나타나 社會적인 문제로 되고 있다. 이에 따라 많은 研究가 進行되고 있으며, 특히 최근에는 肝炎治療에 대한 韓藥物의 研究가 주목되고 있다.^{13,14)}

肝細胞 損傷에 대한 最近의 研究傾向은 漸次 免疫學的인 概念으로 觀察하고 있으며, 方法論적으로는 細胞單位의 代謝 및 apoptosis에 關與하는 蛋白質, DNA, RNA의 活性에 따라 發病原因과 傳變過程을 物質代謝의 相關關係로 判定할 수 있다는 假說^{27,28,43)}에서 出發하고 있다.

細胞의 成長 및 分化의 調節은 細胞가 正常的으로 자라는데 必要로 하는 機構로서, 이 과정에 어떤 原因으로든 간에 均衡이 깨어지게 되면 正常細胞에서 非正常的인 細胞로 되며 無節制한 細胞의 成長은 癌細胞로 發展하는 契機가 되는 것이다. 細胞의 成長은 細胞週期에 따라 이루어지며 細胞週期の 進行은 外部的 또는 內部的인 signal의 傳達를 이어 받아 順次的으로 進行된다.

細胞成長過程에 거치는 cell cycle은 G₁, S, G₂, M phase를 거치는 동안에 段階別로 必要

한 細胞내 物質들이 生産되어 關與하게 되고, 必要한 物質들의 生産은 signal 傳達 cascade를 거쳐 細胞質(cytoplasm) 또는 核內로부터 protein modification 또는 gene expression過程을 거쳐 이루어 진다. 細胞成長에 必要로 하는 여러 細胞내 因子들 중에 cell cycle關聯因子, signal transduction 關聯因子들의 機能이 重要視되며 最近 外國에서는 cell cycle因子들의 同定 및 分離가 可能해지면서 이들의 正常 細胞 成長過程에서의 役割에 대한 研究가 活潑히 進行되고 있다.

細胞週期는 한 細胞가 成長하여 두 細胞로 分裂되는 過程에 모든細胞가 거치는 過程으로 한 細胞週期는 G₁期, S期, G₂期 및 M期로 便宜上 나누고 있다. G₁期는 첫번째 休止期로서 細胞가 分裂된 直後 다음의 成長過程을 始作하기 以前에 必要한 細胞內 因子를 準備하고 適切한 크기의 細胞가 되도록 準備하는 期間으로써 이때 다음 過程인 S期로 가기 위한 充分한 細胞內 因子들이 만들어지지 않으면 다음 期로 가지 못하게 調節하는 첫번째 check point가 있다. 이 check point를 G₁ check point라고 하며 이곳에서는 다음 細胞週期가 始作될 수 있는지 與否를 調査하며 萬若 細胞가 準備가 되어 있지 못하면 cell cycle의 進行을 遮斷하여 細胞가 G₁期에서 arrest되도록 調節한다. 또한 이 G₁ check point는 細胞가 成長過程으로 進行될 것인지 아니면 細胞分化過程으로 들어갈 것인지를 決定하는 重要한 始點이기도 하다. 이 G₁ check point에서의 決定에 따라 細胞는 成長過程 또는 分化過程의 두 길을 달리 가게 된다. 一段 G₁ check point에서 細胞가 成長過程으로 갈 수 있는 條件이 이루어졌다고 判斷되면 細胞는 S期로 넘어간다.

S期에서는 核에 있는 遺傳情報를 가진 DNA의 複製(replication)가 이루어지는 時期로서 한 染色體에서 두 copy의 染色體가 되는 時期이다. 일단 S期에서 DNA가 複製되어 두 copy가 되면 다음에는 두 細胞로 分裂되기 爲해 核 以外에 細胞質 內의 여러 因子들이 複製되어야 한다.

S기가 끝나면서 細胞는 第 2 休止期인 G₂ 期로 넘어가는데 이때 必要로 하는 細胞質의 因子들이 生産되면서 한 細胞가 두 細胞로 分裂되는데 必要한 因子들이 모두 만들어지는 時期이다. 萬若 이 時期에 細胞質의 모든 部分이 充分하게 生成되지 않으면 G₂期에서 다음 細胞의 分裂이 實際로 일어나는 M期로 進行되지 못한다. G₂期에서 M期로 넘어갈 수 있는 지를 調査하는 point가 있으며 이를 G₂ check point라 한다. 이 G₂ check point에서는 G₁ check point에서와 類似하게 實際로 細胞의 分裂이 일어날 수 있는지 與否를 檢討한다. 萬若 細胞分裂이 일어날 準備가 안되어 있으면 細胞週期는 G₂에서 멈추게 된다. 一段 G₂에서 한 細胞가 두 細胞로 될 수 있는 모든 準備가 되어지면 細胞週期는 M期로 넘어간다.

M期에서는 細胞質의 分裂(cytokinesis)이 일어나며 細胞壁이 생기면서 한 細胞가 두 細胞로 實際로 나뉘어지는 時期인 것이다^{15,26)}.

이들 細胞週期가 정상적으로 發顯되기 위해서는 각 段階마다 주요 關聯 因子들이 있다. S phase activator(SPA)는 S phase로 진입을 促進하고, Cyclin E는 G₁ phase 후기에 發顯되고, M phase delaying factor(MDF)와 maturation promotion factor(MPF)는 M phase에 作用하고, 그외에도 많은 CDC(cell division cycle)군, 각종 kinase가 關與한다. 細胞週期에서 가장 중요한 段階는 G₁에서 S로의 變換이다. 이과정을 START 과정이라 부르며 細胞週期는 여기서 주로 調節된다.

Apoptosis(programmed cell death=PCD)는 불필요한 細胞를 除去하는 기작으로 多細胞生物의 發生科程과 恒常性 維持에 중요한 역할을 한다. 生體構造의 形成, 불필요한 構造의 除去, 非正常的의거나 해가 되는 細胞의 除去, 細胞數의 調節等이 PCD를 통해 일어난다²⁹⁾. 外部作用에 의한 細胞의 죽음인 necrosis에서는 죽는 細胞는 부피가 커지면서 결국에는 細胞가 터지고, 밖으로 분출된 細胞質에 의해 炎症反應을 일으키는 반면 apoptosis(PCD)에서는 細胞 부피의 縮小, 細胞

膜 突出, membrane-bound apoptotic body 形成, 核의 染色質 濃縮, DNA 단편화 등이 일어나고, 죽은 細胞는 이웃 細胞의 大食作用에 의해 사라지게 된다.

Apoptosis는 여러 가지 遺傳子 産物에 의해 調節된다³⁰⁾. Apoptosis는 細胞의 增殖을 일으키는 mitosis와 相互 견제하여 필요한 만큼의 細胞數를 유지하게 되는데 肝에서도 정상 肝細胞의 turnover, 肝細胞의 成長과 再生, 肝肥大 혹은 肝萎縮시에 apoptosis가 關與한다⁴⁾.

本 實驗에 使用된 茵陳과 茵陳四苓散加減方은 2000餘年 前부터 黃疸의 治療에 使用되어 온 茵陳五苓散의 主된 藥材들이다. 茵陳五苓散은 張仲景이 黃疸의 治療에 使用한 以來 現在까지도 臨床에서 淸熱利濕을 目標로 慢性肝炎의 治療에 應用되고 있는 處方이다.

茵陳은 淸熱利濕, 退黃疸하는 作用이 있어서 濕熱로 困한 黃疸, 寒濕으로 困한 黃疸, 淸熱의 目的으로 使用되고 있으며 藥理로는 保肝, 利膽, 血清脂質降下, 血壓降下, 抗菌, 解熱作用이 있다^{16,17,18)}. 茵陳을 主材로한 研究에서 茵陳은 血中濃도가 一定한 水準 以上 充分히 維持될 때에 더욱 效果의임을 報告하였으며, 肝機能改善 및 肝損傷回復에 有意한 效果가 있음을 報告하였다⁸⁾¹⁰⁾. 茯苓은 生津止渴, 利水滲濕, 健脾益氣, 寧心安神 등의 效能이 있으며 藥理로는 利尿, 鎮靜, 抗腫瘤, 抗潰瘍作用이 있다^{16,17,18)}. 白朮은 補脾和中, 燥濕, 補氣補血, 利水止汗 등의 效能이 있으며 藥理로는 強壯, 利尿, 血糖降下, 抗凝血, 抗腫瘤, 抗菌, 血管擴張作用이 있다^{16,17,18,19)}.

Etoposide는 VP-16이라고도 불리우며, podophyllum계통의 podophyllo-toxin의 誘導體로서 DNA fragmentation을 일으켜서 활발한 apoptosis를 誘導한다. 白血病, 膀胱癌, 辜丸腫瘍, 肺小細胞癌, 비호치킨 림프종 등 各種 癌疾患의 複合化學療法으로 應用되고 있다^{20,21)}.

本 實驗에서 使用한 MTT 檢査方法은 cell의 viability를 測定하는 方法으로 1983年 Mosmann³¹⁾에 依해 처음 試圖되었으며, 1986

年 Cole³²⁾과 1988年 Alley등에 의해 사용되기 시작하여 최근 널리普及되었다.

MTT는 3-[4,5 - dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ; Thiazolyl blue 이며, 100mg, 250mg, 500mg 등 다양한 용량의 yellow water-soluble tetrazolium 염색으로 세포의 viability에 따라 MTT-formazan의 양이 달라지며 이를 적절한 용매에 작용시킨 후 spectrophotometer로 읽어내어 세포의 생존능력을測定한다.

RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)은 傳統적으로 特定 遺傳子の RNA分析에 사용된 Northern blot의 問題點을 克服하는 方法^{25,33)}이다. 既存 Northern blot方法의 短點인 一箇 遺傳子分析에 5~10 μg의 RNA를 必要로 한다는 點과 同位元素의 使用이 必須的이라는 問題點을 解決한 方法으로 微量(1μg以下)의 RNA만으로도 特定 遺傳子の 分析이 可能하기 때문에 敏感度가 뛰어나며, 同位元素의 使用이 必要하지 않다는 點 때문에 最近 大部分의 分子生物學의 研究에 使用되어지고 있다. 그러나 細胞 또는 組織속에 存在하는 核酸의 template가 100萬培 以上으로 增幅된다는 事實로 因하여 定量分析은 PCR施行 後에 그 product의 電氣泳動上의 DNA-band의 強度만으로 結果를 서로 比較할 수 없는 短點은 繼續적으로 가지고 있다. 最近에는 標準 RNA를 利用하여 한 試驗管에서 逆轉寫가 일어나게 한 後 그 cDNA를 次例로 稀釋하고 各各을 PCR로 增幅하여 映像密度計(densitometer)로서 定量化하는 方法등을 利用하여 mRNA 定量方法을 確立하여 短點을 補完하였다.^{22,33)}

本 實驗에서 茵陳과 茵陳四苓散加減方은 etoposide로 유도된 細胞의 損傷을 막아주고, 細胞의 生存능력을 향상시켰음을 보였다. Cell cycle analysis로도 이와 類似한 結果를 얻었다. 이에 茵陳清肝湯加味方이 cell cycle에 미치는 影響을 遺傳子 level(p53, Waf1, PCNA, Gadd⁴⁵⁾에서 確認하였다.

1979年 Lane과 Crawford³⁴⁾는 SV40 tumor virus에 依하여 形質轉換된 細胞에서 large T

抗原과 結合하는 分子量 53 kD의 蛋白質을 發見하고, 이 蛋白質을 SV40에 依한 形質轉換代謝에 關與하는 細胞性 因子로 發表했다. 곧 이어서 human, mouse등의 p53遺傳子が 分離되었다. p53蛋白質이 癌細胞에서 많이 存在하고 正常細胞에서는 거의 檢出되지 않는 水準으로 發顯되기 때문에 p53遺傳子の 高發顯이 細胞의 發癌過程에 關與할 것이라고 생각되었다. 또한 癌細胞에서 分離한 p53遺傳子를 ras 或은 myc등의 發癌遺傳子와 同時에 REF細胞에 transfection하면 transformation을 誘導한다는 事實은 p53遺傳子를 發癌遺傳子로서 認識하게 되었다.^{13,35)} 그러나 약 10年間에 걸친 發癌遺傳子로서의 p53遺傳子の 機能解釋은 1989年 전혀 豫想하지 못하였던 方向으로 轉換되었다. 1989年 美國 Princeton大學의 Arnorld Levine博士研究팀과 이스라엘 와이즈만 研究所의 Moshe Oren博士 研究팀이 各各 wild type p53遺傳子の 分離에 成功하고 이를 정상 및 癌細胞에 導入한 結果 p53遺傳子は 正常細胞의 transformation을 誘導하는 것이 아니라 오히려 細胞의 形質變換을 抑制하며, 癌細胞의 tumorigenesity를 抑制한다는 事實이 밝혀졌다. 이로써 p53遺傳子를 癌 抑制遺傳子로 다시 命名하고 전혀 새로운 方向으로 活潑한 研究가 進行되고 있다. Hepatocyte에 p53 deficiency 상태가 되면 hepatocyte proliferation은 증가하고 TGF β 등의 分열억제인자는 감소하는 것으로,³⁶⁾ p53 遺傳子は G₁ phase의 check point에서 arrest를 일으켜 apoptosis에 關與한다고 알려졌다.^{27,34)}

Hepatitis B virus와 연관된 hepatocellular carcinoma에서 HBV X protein이 존재하지 않아도 mutant p53이 발현된다³⁷⁾. 현재 國內外에서도 肝癌, 胃癌, B 細胞림프종, 파터씨 팽대부암, 유두종, 原發性肺癌²⁹⁾ 등의 發見 및 豫後判定の 基準으로 應用하기 위한 研究가 계속되고 있다.

p21 蛋白質은 Waf1, Cap20, Cip1, Sdi1등으로도 알려져 있는데 서로 다른 實驗室에서 다른 方向에서 接近하여 同定되었기 때문이

다³⁶⁾. p21은 老化된 細胞에서 그 量이 增加하므로 細胞分裂을 抑制하는 것으로 알려져 있다. p21遺傳子 發顯은 p53이 p21의 promoter site에 結合하여 增加시키는 p53依存的 經路와 이와 無關한 p53非依存的 經路에 依해 調節됨이 最近 밝혀지고 있다^{36,38)}. 正常的인 細胞에서 p21은 4個의 複合體로 發見되는데 Cyclin, CDK, PCNA와 結合물을 이루고 있다. p21은 細胞週期の G₁ 段階에 중요한 역할을 하는 CDK (cyclin-dependent kinase)의 inhibitor로 作用하며, DNA polymerase를 抑制하여 G₁ arrest로 誘導한다. 따라서 p21은 損傷된 DNA를 monitor하는 G₁ check point에 必須的인 蛋白質이다³⁹⁾. 正常 成人에서 p21이 많이 發顯되는 組織과 細胞들은 甲狀腺, 前立腺, 骨格筋, 腎臟, 乳房, 睪丸, 消化器官의 上皮細胞, 皮膚의 皮脂細胞 등이다³⁶⁾. Young-rat hepatocyte에서 p21은 S phase에 많이 發顯되는데 비해 old rat-hepatocyte에서는 G₁ phase에 많이 發顯되는데 이는 p21이 liver regeneration, cell cycle의 進行을 억제시키기 때문이다. Hepatocellular carcinomas의 p21발현은 p53의존적 經路를 조절하는 것으로 추정된다⁴⁰⁾. PCNA(proliferating cell nuclear antigen)은 SLE患者의 血清에서 自家抗體로서 처음 발견되었고⁴¹⁾, 36KD의 분자량을 가지고 있는 DNA polymerase-delta의 補助蛋白으로 DNA合成과 細胞增殖에 밀접하게 연관되어 있다. 주로 細胞週期の G₁後期에 나타나 S phase에 最高에 도달하였다가 G₂期 및 M期에 점차 減少하는 것으로 알려져 있으며 이와같은 特性으로 cyclin으로 불리우기도 한다⁴²⁾. 최근에는 惡性 淋巴腫, 胃癌, 胃腸筋 平滑筋 腫瘍, 子宮腫瘍, 喉頭頸頭腫瘍後因子로 이용되고 있다^{23,24)}.

Bcl-2는 분자량 26kD의 protein으로서 chemoresistance에 중요한 役割을 擔當하여 여러 種類의 刺戟에 대해 apoptosis를 block하는 特異 機能을 가지고 있다고 알려져 있다. 臨床的으로 Bcl-2의 發顯은 non-Hodgkin's lymphoma, acute myelogenous leukemia,

prostate cancer 및 neuroblastoma에서 나타나며, 이의 發顯은 좋지않은 prognosis와 낮은 治療反應을 反映한다.

Bcl-2의 overexpression과 cytotoxic agent로 因한 cancer chemoresistant 形態는 tumor cell apoptosis의 program完成을 阻害한다^{42,43)}. Bcl-2 family에 屬하는 關聯蛋白인 Bcl-2, Bax 등의 發顯은 cell이 apoptosis로 進行時 感受性を 決定한다³⁵⁾. Bcl-2 Family중 Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1은 apoptosis를 억제하고, Bcl-Xs, Bax, Bak, Bad, Bid는 cell death를 증진시킨다. Bcl-2와 bax는 서로 相對的인 protein으로 大部分의 境遇 heterodimer의 形態로 存在한다고 알려져 있다. 따라서 low Bcl-2와 high Bax level에서 cell의 spontaneous apoptosis가 일어나며, 反面에 non-apoptotic cell에서는 high Bcl-2와 low Bax level이 나타남을 發見하였다²⁷⁾. Bcl-2나 Bax의 single form인 homodimer가 늘어나게 되면 그 것이 apoptosis의 signal이 되는 것이다. Bcl-2 gene은 liver transplantation에서 중요한 문제중의 하나인 이식조직의 hypoxic hepatocyte death을 막는다. 또한 liver regeneration시 Bcl-2 family는 apoptosis-modulating gene의 역할을 擔當한다. primary biliary cirrhosis에서 hepatocyte, epithelial cell과 bile duct를 결찰시켜 유발된 cholestasis의 hepatocyte에는 Bcl-2가 發顯되는데, 이는 toxic bile salt에 의한 apoptosis에 저항하는 현상이다.

Bax는 tumor suppressor로 작용하며, p53 mediated apoptosis를 刺戟시킨다. 또한 chemotherapy로 유발된 apoptosis에도 증가된다.

茵陳과 茵陳四苓散加減方을 투여하면 apoptosis 촉진 遺傳子인 Bax에는 변화가 없는 반면에 apoptosis 억제 遺傳子인 Bcl-2, Bcl-XL은 농도의존적으로 증가시키고 있다.

이상의 實驗結果에서 茵陳과 茵陳四苓散加減方은 MTT assay 結果 細胞활성을 약간 증가시켰으며 細胞 주기 進行의 유도가 유의성있게 관찰되었다. 면역細胞계측 분석에 의

하면 茵陳과 茵陳四苓散加減方처리 細胞군에서 시간과 농도 의존적인 PCNA발현의 유의한 증가가 관찰되었으며 Flow cytometry를 이용한 분석에서도 유의한 유도가 관찰되었다. DNA 손상으로 유발된 apoptosis의 억제 실험에서도 대조군과 비교하여 약 3배 가량의 apoptosis감소가 관찰되었으며 Flow cytometry를 이용한 유세포계측 분석에서는 대조군의 apoptosis 細胞들은 39.9%인 반면에 茵陳과 茵陳四苓散加減方 처리군은 각각 19.6%, 17.4%로 나타났다.

정량적 RT-PCR을 이용한 apoptosis 관련 遺傳子의 分析에서는 茵陳과 茵陳四苓散加減方 처리군 모두에서 Gadd45 mRNA 발현의 유의한 증가가 관찰되었으며 apoptosis 촉진 遺傳子인 Bax에는 변화가 없는 반면에 apoptosis억제 遺傳子인 Bcl-2, Bcl-XL은 농도 의존적으로 증가됨을 볼수 있었다.

따라서 茵陳과 茵陳四苓散加減方은 肝細胞의 活性을 높이고 細胞週期 및 apoptosis에 關與하는 遺傳子의 發現을 통해 細胞의 損傷을 抑制하는 肝保護 效能이 認定되었다.

向後 apoptosis發顯過程에서 主된 作用을 하는 構成藥物에 대한 探索 및 調節 方法의 創出 등에 關해서는 좀 더 持續的인 研究가 이루어져야 할 것으로 思料된다.

VI. 결 론

茵陳과 茵陳四苓散加減方이 肝細胞의 活性, 細胞週期 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 影響을 確認하고자 MTT assay, cell cycle analysis, PCNA expression analysis와 tryphan blue exclusion assay, flow cytometry assay를 施行하고, 各 遺傳子 發現을 把握하기 위하여 quantitative RT-PCR을 實施하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT assay의 結果 茵陳과 茵陳四苓散加減方은 HepG2 cell의 細胞活性을 增加시켰으며, 이는 濃度依存的으로 나타났다.
2. Cell cycle analysis의 結果 茵陳과 茵陳

四苓散加減方處理群에서 細胞 週期가 有意性 있게 增進되었다. 對照群에서 68.3%가 G1期에 있었던 反面에 茵陳과 茵陳四苓散加減方處理群은 各各 47.3%와 44.8%로 減少하였다.

3. PCNA expression analysis에서는 茵陳과 茵陳四苓散加減方處理群에서 時間과 濃度依存的으로 PCNA 發現이 有意性 있게 增加되었다. 茵陳에 比해 茵陳四苓散加減方에서 약간 더 높은 效果를 나타내었다.

4. Tryphan blue exclusion assay 結果에서는 茵陳과 茵陳四苓散加減方處理群에서 etoposide로 誘發된 apoptotic cells의 有意한 減少가 觀察되었으며 이것은 用量依存的으로 나타났다. 對照群과 比較하여 10 μ g/ml의 濃度로 處理된 茵陳 또는 茵陳四苓散加減方處理群에서 약 3배 가량의 apoptosis 減少가 觀察되었다.

5. Flow Cytometry assay에서도 茵陳과 茵陳四苓散加減方處理群의 有意한 apoptosis 減少가 觀察되었다. 對照群의 sub G1 段階의 apoptosis 細胞들이 39.9%인 反面에 茵陳과 茵陳四苓散加減方 處理群은 各各 19.6%, 17.4%였다.

6. Quantitative RT-PCR 結果에서 茵陳과 茵陳四苓散加減方處理群은 Gadd45 mRNA 發現을 有意性 있게 增加시키고, apoptosis 促進 遺傳子인 Bax에는 變化가 없는 反面에 apoptosis 抑制 遺傳子인 Bcl-2, Bcl-XL을 濃度依存的으로 增加시켰다.

以上的 實驗結果에서 茵陳과 茵陳四苓散加減方은 肝細胞 活性을 높이고, 細胞週期 및 apoptosis에 關與하는 遺傳子 發顯에 關係하여 細胞 損傷을 抑制하며 肝機能을 保護하는 效能이 認定되므로, 臨床에서 各種 肝疾患에 多樣하게 使用 할 수 있는 根據를 提示한 것으로 思料된다.

참고문헌

1. 統計廳 : 96年度 死亡原因統計結果, 서울, pp.20-40, 1997.
2. 김창민 : 아포토시스와 간질환, The Korean Journal of Hepatology, Vol. 2, No. 2,

pp96-103, 1996.

3. 박전희 : 細胞의 열에 대한 반응시 생기는 생화학적 변화와 apoptosis에 관한 연구, 서울, 이화여자대학교 대학원, 1996.
- 4.李志英 : 산화적 스트레스에 의한 Apoptosis의 유발과 항산화효소, 항산화제 및 항암제와의 관계, 서울, 이화여자대학교 대학원, 1996.
- 5.張仲景 : 仲景全書, 서울, 高文社, pp. 225, 408-411, 1984.
- 6.張仲景 : 金匱要略, 서울, 杏林書院, pp. 392-394, 1984.
- 7.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, 第14卷1號, pp216-223, 1993.
- 8.禹弘楨 : 茵陳五苓散과 茵陳增量한 構成方이 흰쥐 肝損傷에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 第13卷1號, pp234-241, 1992.
- 9.李長勳 : 肝疾患治療劑의 效能에 관한 實驗的研究. 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 - 肝臟編, 大韓韓醫師協會, pp.123-165, 1995.
- 10.朴亨圭 : 茵陳四苓散이 急性 Alcohol, 高脂肪食 및 Galactosamine中毒 白鼠의 損傷肝에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 第14卷2號, pp254-269, 1993.
- 11.洪尙勳 : 茵陳清肝湯加減方이 肝細胞活性, 細胞週期 및 apoptosis에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1998.
- 12.王琦·李炳文·邱德文·王廣其·彭榮琛 : 黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, p.94, 1983.
13. Hong Jung Woo, Jang Hoon Lee : Effects of Samchil-Saenggan Tang on liver injury, The Kyung Hee University Oriental Medical J., Vol. 17, No. 2, pp.17-39, 1994.
14. Hong Jung Woo, Jang Hun Lee, Young Chul Kim, Sang Man Kim, Sun Min Kim, Yong JIn Park, Sung Soo Kim, In Sug Kim, and Joo hun Ha : A Study on the therapeutic effect of oriental medicine on Hepatitis B, The Kyung Hee Medicine, Vol. 13, No. 3, 1997.
15. 맹영희 : Molecular genetic characterization of the pathway of p53 Tumorsuppressor gene in human stomach cancer, 서울, 慶熙大學校大學院, 1996.
- 16.全國 韓醫科大學 本草學教授 : 本草學, 서울, 永林社, p.56, 58, 149, 281, 284, 285, 358, 378, 393, 455, 456, 513, 1991.
- 17.李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, p.400, 446, 549, 781, 925, 1188, 1224, 1229, 1983.
18. Xu shu nan, Niu bing zhan bian zhu : Shen Nong Ben Cao Jing, Men Guang Press, p.11, 12, 18, 35, 41, 82, 100, 1994.
19. 임강현 : 白朮類의 效能 比較 研究, 서울, 경희대학교 대학원, 1997.
- 20.곽영임 : 중등도 또는 고도의 비호지킨 림프종에 대한 VACOP-B(Etoposide/Doxorubicin/Cyclophosphamide/Vincristine/Prednisolone/Bleomycin) 복합화학요법의제 2상 연구, 서울, 이화여자대학교 대학원, 1996.
21. Kwon soon in : Cisplatin and Etoposide (VPP) Combination Chemo-therapy in Small
22. 정현채, 김정목, 송인성, 김정룡 : 人體 大腸 上皮細胞 및 大腸粘膜에 發顯된 여러 Cytokine 遺傳子의 定量分析을 통한 人體 宿主 防禦機轉에 關한 研究-合成 RNA를 利用한 定量的 逆轉寫 PCR法의 應用, 서울, 大韓內科學會誌, 第49卷 1號, pp.1-13, 1995.
23. 이동엽 : 후두유두종에서 PCNA표현양상에 따른 예후추정 및 임상적의의에 관한 연구, 서울, 경희대학교 대학원, 1996.
24. 최정환 : 위장관 평활근 종양의 예후 지표로서 PCNA 면역조직화학염색의 유용성, 서울, 경희대학교 대학원, 1994.
25. 김대곤, 임수일, 안득수 : Hep G2 肝癌細胞株에서 Retinoic Acid가 p53 蛋白質, Ki-67 및 PCNA/Cyclin發顯에 미치는 效果, 全州, 大韓內科學會誌, 第49卷 2號, pp.210-220, 1995
26. 이준성, 송동화, 박찬욱, 이문성, 조성원, 심찬섭, 진소영 : 重合酵素 連鎖反應法을 利用한 Helicobacter pylori의 檢出, 서울, 大韓內科學會誌, 第49卷 3號, pp.347-359, 1995.
27. Leist M., Gartner F., Naumann H., Bluthmann H., Voget K., Brigelrus-Flohe R., Nicotera P., Volk H. D., and Wendel

- A. : Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins, *Gastroenterology*, Vol. 112, pp.923-934, 1997.
28. Lin D., Fiscella M., O'Connor P. O., Jackman J. J., Chen C., Luo Ling L., Sala A., Travali S., Appella E., and Mercer E. : Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, No. 21, pp.10079-10083, 1994.
29. Jacobson M. D., Weil M. and Raff M. C. : Programmed cell death in animal development, *Cell*, Vol 88, pp.347-354, 1997.
30. Wyllie A. H. : Apoptosis, *Br. J. Cancer*, Vol. 67, pp.205-208, 1994.
31. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunologic methods*, Vol. 65, No. 1-2, pp.55-63, 1983.
32. Cole S. P. : Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, *Cancer chemother Pharmacology*, Vol. 17, No. 3, pp.259-263, 1986.
33. Ferre F. : Quantitative or semi-quantitative PCR : reality versus myth, *PCR Methods and Applications*, Vol. 2, pp.1-9, 1992.
34. Lane D. P., Crawford L. V. : T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells, *Nature*, Vol. 278, pp.261-263, 1979.
35. Ginsberg D., Mechta F., Yaniv M., and Oren M. : Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, No. 22, pp.9979-9983, 1991
36. Bellamy C. O. C., Clarke A. R., Wyllie A. H., and Harrison D. J. : p53 deficiency in liver reduce local of survival and proliferation, but does not affect apoptosis after DNA damage, *The FASEB J.*, Vol. 11, No. 7, pp.591-599, 1997.
37. Henkler F., Waseem N., Golding M. H. C., Alison M. R., and Koshy R. : Mutant p53 but not Hepatitis B Virus X Protein Is present in Hepatitis B Virus related Human Hepatocellular Carcinoma, *Cancer Res.*, Vol. 55, pp.6084-6091, 1995.
38. Datto M. B., Yan Li, Panus J. F., Howe D. J., Xiong Y., and Wang Xiao-Fan : Transforming growth factor induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, No. 12, pp.5545-5549, 1995.
39. Waga S., Hannon G.J., Beach D. and Stillman, B. : The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinase normal controls DNA replication by interaction with PCNA, *Nature*, Vol. 369, pp.574-578, 1994.
40. Albrech J. H., Mayer A. H., and Humy m. Y. : Regulation of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/Cip1/Sdi1 Gene Expression in Hepatic Regeneration, *J. Hepatology*, Vol. 25, No. 3, pp.557-563, 1997.
41. Mayer A., Takimoto M., Fritz E., Schellander G., Kofler K., Ludwig M. : The prognostic significance of the proliferating nuclear antigen, epidermal growth factor receptor and mdr gene expression in colorectal cancer, *Cancer*, Vol. 71, No. 15, pp.2454-2460, 1993.
42. Celis J. E., Bravo R., Larsent P.M. : Review cyclin: a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells, *Leuk Res.*, Vol. 8, No. 2, pp.143-157, 1994.
43. El-Deiry W. S., Tokino-T., Velculesou-V. E., Levy-V. E., Parsons-R., Trent-J. M., Lin-D., Mercer-W. E., Kinzler-K. W., Vogelstein -B. : WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell*, Vol. 75, No. 4, pp.817-825, 1993.