

원저

茵陳清肝湯의 抗癌效果에 關한 研究

우홍정, 이장훈, 김영철
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Study on the Anti-Cancer Effect of Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang)

Hong-Jung Woo, Jang-Hoon Lee, and Young-Chul Kim

Department of Liver Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Kyunghee University, Seoul, Korea

Objectives: Hepatoma is a very serious disease in Korea and worldwide. Hepatitis B virus (HBV) has proved the most significant cause of hepatoma. We carried out this study to investigate the effect of Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang) on inhibiting cell proliferation and DNA synthesis in HepG2.2.15 cell lines and on inhibiting phosphorylation of oncogene (MAP kinase) in NIT/3T3-HBx cells.

Methods: First we confirmed the Hepatitis B virus producing ability of HepG2.2.15 cells. To investigate the anti-cancer effect of Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang), we did the MTS/PMS assay, [3H]-thymidine incorporation assay and transfection of pcDNA-X. We also measured the gene expression through western blotting.

Results: Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang) showed the suppressing effect of HepG2.2.15 increase in the MTS/PMS assay and the inhibiting effect of DNA synthesis of HepG2.2.15 in the [3H]-thymidine incorporation assay. Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang) also showed the inhibiting phosphorylation effect of MAP kinase in HBV-X genes.

Conclusions: From the above Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang) is thought to have an anti-cancer effect on the hepatoma from HBV. It is suggested that further studies on this prescription would give us a better medicine with an anti-cancer effect.

Key words: Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang), hepatoma, oncogene, phos-phorilation, HBV-X gene

· 접수 : 1999년 11월 24일

· 채택 : 2000년 1월 25일

· 교신저자 : 김영철, T. 02-958-9122

이 논문은 한국한의학연구원에서 시행한 한방치료기술연구개발사업에 의해 연구되었음.

I. 서 론

우리나라에서는 만성간질환이 40대부터 50대 남성의 사망원인 중에서 1위를 차지하고 있으며, 특히 간암으로 인한 사망률은 우리나라가 세계 1위를 차지하는 것으로 보고되었다¹⁾. 전세계적으로는 간암으로 인한 사망자가 매년 1000000명을 넘는 것으로 추정되고 있다. 역학적으로 살펴볼 때, 간암은 간염바이러스의 이환율이 높은 아프리카와 동남아시아에서 흔한 것으로 알려져 있으며²⁾ 세계적으로 유병률이 증가되는 추세에 있어서 이의 치료에 대한 관심이 날로 증가하고 있는 실정이다.

간암의 증후에 대한 韓醫學에서의 기록은 內經에서부터 있어왔다. 그 가운데서도 黃疸, 積聚, 脹滿 등의 證候에서 유사한 증후와 病因病理 및 治療에 대한 많은 기록들이 있다³⁾. 현대적인 의미에 있어서 간암의 발생과 밀접한 관련이 있다고 인정되는 바이러스성 간질환에 韓醫學的 치료는 효과적이어서, 한의학 임상에서도 만성간질환의 치료에 활발하게 응용되고 있다.

본 실험에서 사용된 茵陳清肝湯은 A.D. 200년경 張⁵⁾이 濕熱黃疸의 치료에 사용한 茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고 地榆, 蘿菔子, 靑皮, 砂仁 등을 가미한 처방으로 임상에서 바이러스성 간질환의 치료에 清熱利濕을 목표로 빈번하게 사용되어 왔다. 최근에는 茵陳清肝湯을 使用하여 血清內 肝酵素値를 正常化시키며 B형 肝炎 바이러스의 HBeAg의 seroconversion에 有意性 있는 效果가 있음이 報告되었다⁶⁾. 따라서 본 처방은 HBV로 인한 간암발생에도 효과적일 것으로 생각되었다.

본 실험에 사용한 HepG2.2.15 cell line은 HepG2 세포에 HBV가 integration 되어있는 세포로 HBV의 증식과정이 바이러스 자체의 중합효소로 일어나며 유전자의 발현 역시 실제 간암에서와 유사하게 일어나기 때문에 HBV-X gene의 암발생에 대한 연구에도 활용되고 있으며, NIH/3T3 fibroblast는 분화되기 이전의 정상 섬유모세포로서 분열과 증식에 관한 성질을 나타내기 때문에 발암유전자

의 연구에 흔히 사용되는 세포주이다. 본 실험에서는 이 두 가지 세포주에 茵陳清肝湯을 처리하여 이 약재가 가지는 항암효과를 검증하였다.

II. 본 론

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용한 약재는 경희대학교 한의과대학 부속한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며 내용 및 1貼 당 분량은 다음과 같다.

Table I : Contents of Formula (Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang))

Herbs	Botanical Name	(g)
茵陳	Artemisiae Caillaris Herba	50g
地榆	Sanguisorbae Radix	16g
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	12g
豬苓	Poyporus	12g
白茯苓	Hoelen	12g
茜草根	Rubiae Radix	12g
烏犀角	Bubalus Bubalis	8g
澤瀉	Alismatis Rhizoma	8g
蘿菔子	Raphani Semen	8g
靑皮	Aurantii Immatri Pericarpium	6g
砂仁	Amomi Semen	6g
甘草	Glycyrrhizae Radix	6g

2) cell line

HepG2 세포에 HBV가 integration되어 있는 HepG2.2.15 cell line과, NIH/3T3 fibroblast 세포주에 목암연구소의 윤영대 박사에게서 수여받은 pcDNA-X를 transfection시킨 NIH/3T3-HBx 세포주를 사용하였다⁷⁾.

2. 方法

1) 약재준비

茵陳清肝湯 1첩 분량 156g을 Round Flask에 넣고, 냉각기를 부착한 상태에서 증류수 1500ml을 가하여 100℃에서 2시간씩 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 여액을 80℃ 물증탕에서 감압농축하였다. 이후 냉동 tray에 전탕액을 담고 -40℃에서 3시간동안 급속 냉동시킨 후 가열판온도 40℃이하 진공도

0.4mmHg에서 72시간동안 동결건조시킨다(동결건조기 : Christ LDC-A, Alpha 1/4, Germany). 얻어진 건조분말 시료 34.5g(수득율 : 22.1%)을 50mg/ml의 농도로 80℃에서 2시간 동안 증류수에 넣은 후 ultrasonication을 시행하였고 잡질을 제거하기 위하여 40,000rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 0.2 μ m syringe filter로 여과한 후 culture media에 적정농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) Cell culture

HepG2.2.15은 10% Fetal bovine serum(FBS) RPMI1640 media를 사용하였으며 HBV 유전자를 유지하기 위해 계대배양할 때마다 400 μ g/ml의 geneticin을 가해주었다. NIH/3T3 cell은 10% FBS DMEM을 사용하였으며, 37℃, CO₂ incubator에서 배양하였다.

3) HepG2.2.15 cell의 Hepatitis B Virus producing ability 확인

HepG2.2.15 cell이 배양 중에 정상적으로 HBV particle을 방출하는지 확인하기 위해 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 거두어 PCR을 위한 template로 사용하였다. PCR을 시행하고 1% Agarose gel에 loading하여 transilluminator로 band를 확인하였다.

4) 약물의 항암효능 검사

가. MTS/PMS assay

세포증식에 미치는 약제의 효능을 검증하기 위하여 Promega사의 CellTiter 96 AQueous Non-radioactive Cell Proliferation assay kit를 사용하여 MTS/PMS assay를 시행하였다. 우선 HepG2.2.15 세포들을 96 well plate에 well 당 10⁴개씩 분주한 다음 세포가 바닥에 붙어 정상적으로 성장하기 시작할 때, 약제를 주어진 농도대로 48시간 처리하였다. 그 후 MTS/PMS(20:1) 용액을 well 당 20 μ l 씩 넣어주고, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 동안 incubator에서 반응시킨 후, 470nm 파장의 ELISA reader로 O.D.를 측정하였다.

나. [³H]-thymidine incorporation assay

DNA 합성에 미치는 약제의 효능을 검증하

기 위하여 tritiated thymidine incorporation assay(Amersham)를 시행하였다. 먼저 세포를 24well plate에 10⁵개 씩 분주하고, 약제를 48시간 동안 처리한 후 [³H]-thymidine을 10uCi되게 각 well에 가해주었다. 16시간 반응시킨 후 배지를 걸어내고 0.5N NaOH를 가한 후 4℃에서 4시간 동안 반응시켜 DNA를 추출하여 scintillation cocktail 5ml에 넣어 β -counter로 측정하였다.

다. pcDNA-X의 transfection

E.coli stock을 이용하여 competent cell을 제작하고, 여기에 pcDNA-X를 함유한 plasmid를 섞어서 배양하여 cloning을 한 후 증폭된 plasmid를 추출하였다. 이렇게 하여 대량으로 얻어진 plasmid를 transfection 시켜서 실험에 사용하였다.

Transfection은 Qiagen사의 제품(Efectene)을 이용하여 시행하였다. Transfection 전날 12 well plate에 cell을 분주하여 50%정도 confluent한 상태가 되면, 75 μ l Buffer EC에 0.3 μ g plasmid DNA, 2.4 μ l Enhancer를 넣어 잘 섞은 후 실온에서 약 3분간 배양하고, 다시 6 μ l Effectene reagent를 넣고 잘 섞어서 실온에서 약 5분간 배양한 후 400 μ l 10% FBS DMEM을 잘 섞어서 이것을 배양액에 넣어서 37℃, CO₂ incubator에서 18시간동안 배양한 후 배지를 교환하였다.

라. Western blotting을 통한 유전자 발현도 측정

약제처리된 세포를 찬 PBS로 두 번 씻어내고 lysis buffer[50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM EDTA (pH8.0), 1% protease inhibitor cocktail solution(Sigma)]를 가하여 세포를 녹였다. 녹인 세포를 4℃, 12000 xg에서 15분동안 원심분리하여 상청액을 취하고 BCA protein assay kit(Pierce)를 이용하여 단백질농도를 측정하였다. 얻어진 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 분리하고 gel을 transfer buffer(20mM Tris-HCl pH8.3, 150mM NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween-20) 하에서 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schnell)에 transfer

한 후 membrane을 blocking solution(10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween-20) 하에서 1시간 동안 흔들면서 blotting 시킨 후 antibody를 포함한 TBST(10mM Tris-Hcl pH7.5, 0.9%NaCl, 0.05% Tween-20)중에 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 enhanced chemiluminescence system(ECL, Amersham)을 사용하여 단백질을 검출하였다.

5) Statistical analysis

통계처리는 microsoft사의 EXCELL program을 사용하였으며, 각 군간의 비교는 처리군에 따른 차이를 확인하기 위하여 일원배치분산 분석을 사용하고, DNA 합성도와 약제의 농도간의 선형관계가 추정되어 이후 회귀분석을 실시하였다.

III. 실험결과

1. HepG2.2.15 cell의 Hepatitis B Virus producing ability 확인

HepG2.2.15 cell이 배양 중에 10% FBS RPMI1640 배지내에 정상적으로 HBV particle을 방출하는지 확인하기 위해 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 거두어 PCR을 위한 template로 사용하였다. PCR을 시행하고 1% Agarose gel에 loading하여 transilluminator로 확인한 결과, HBsAg(+), HBeAg(+),인 환자혈청을 양성 대조군으로 사용한 것과 같은 위치에서 PCR band가 나타나는 것이 확인되었고, 이것으로 HepG2.2.15 cell이 배양 중에 정상적으로 HBV particle을 방출하는 것임을 확인할 수 있었다.

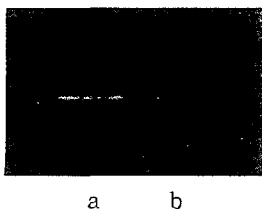


Figure 1. Bands of PCR products
a: HBV positive serum. b: Media of HepG2.2.15 cell

2. 세포 증식도 측정

HBV X 유전자의 간암 발생에 한약재가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 시료를 500 μg/ml, 1000μg/ml, 1500μg/ml의 농도로 HepG2.2.15 cell에 48시간 동안 처리한 다음, 방사성 동위원소를 측정하지 않고 세포 증식도를 측정할 수 있는 MTS-PMS assay를 시행하였다.

MTS/PMS assay에서 측정한 formazan product의 흡광도(OD) 값은 세포 증식도와 비례하므로 OD 값의 감소는 세포증식의 저하를 의미하는 결과로 볼 수 있으며, 이는 이후 과정의 예비실험적인 성격도 가지는 것이다. Table II에서 보는 바와 같이茵陳清肝湯을 투여한 HepG2.2.15 cell line의 세포증식도는 농도에 비례하여 유의성있게 감소됨을 알 수 있었다(p<0.01). Figure 2에서 나타나는 바와 같이 농도에 비례하여 지수함수적으로도 감소함을 알 수 있다.

Table II. MTS/PMS Assay of Cell Proliferation Treated with Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang)

Herb	Concentration (ug/ml)	No. of group	Mean O.D.	Standard Deviation	Standard Error	P value
	0	3	1.661	0.1308	0.0755	
Injinchunggan-tang	500	3	1.6433	0.1096	0.0633	<0.01
	1000	3	1.3287	0.2082	0.1202	
	1500	3	1.0247	0.0534	0.0308	

O.D. : optic density

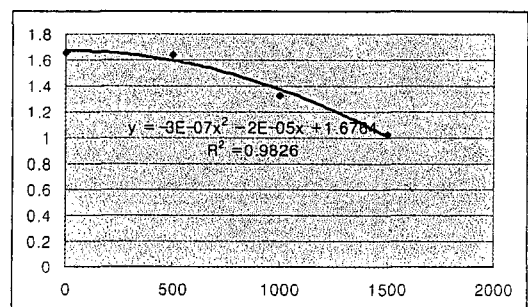


Figure 2. MTS/PMS assay of cell proliferation treated with Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang), which shows concentration dependant decrease in O.D.

3. HepG2.2.15 세포의 DNA 합성도

세포주기중의 S기에서 일어나는 DNA 복제량을 측정하기 위하여 [³H]-thymidine 10uCi를 세포 분열 한 주기의 시간인 18시간 동안 처리하였다. β-counter로 측정한 CPM (counter per minute) 값은 농도에 비례하여 지수함수적으로 감소되는 경향을 보였으며, figure 3에서와 같이 $y=6095.2e^{-0.0012x}$, $R^2=0.8952$ 로 나타나서 유의성있는 감소경향을 보여주었다. 이는茵陳清肝湯의 투여가 HepG2.2.15 cell의 DNA 복제를 억제하였음을 보여주는 결과이다.

Table III. [³H]-thymidine Incorporation Assay of HepG2.2.15 cell DNA Synthesis Treated with Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang)

Herb	Concentration (ug/ml)	Mean C.P.M.	SD
	0	8329.5	987.8282
M2	500	2991.5	123.7437
	1000	1469.5	113.8442
	1500	1345	55.15433

C.P.M. : counter per minute
SD : standard deviation

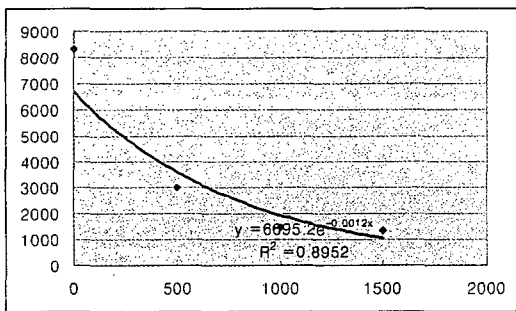


Figure 3. [³H]-thymidine incorporation assay of HepG2.2.15 cell DNA synthesis treated with Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang). Graph shows concentration dependant decrease of the level of thymidine incorporation.

4. HBxAg의 작용에 미치는 영향

한약이 HBxAg의 간암발생에 있어서 발암 유전자의 인산화에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 MAP kinase를 측정하였다.

(1) pErk western blot

NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 그리고 약제는 500μg/ml의 농도로 3시간 동안의 serum 처리와 동시에 시행하였다. 또한 양성 대조군으로 Erk의 inhibitor로 알려진 PD98059를 처리하였다.

먼저 pcDNA-X를 transfection시킨 대조군과 pcDNA1만을 transfection시킨 음성대조군 사이의 차이를 Figure 4에서 볼 수 있다. 즉, 같은 조건에서 같은 처리를 했음에도 불구하고 NIH/3T3-HBx의 Erk가 훨씬 더 많이 인산화되어 있음을 알 수 있으며,茵陳清肝湯을 투여한 뒤에는 인산화가 감소되어 있음을 보여주고 있다. 그러나 PD98059 처리군에서 pErk의 양이 그다지 변하지 않은 것으로 나타났다.

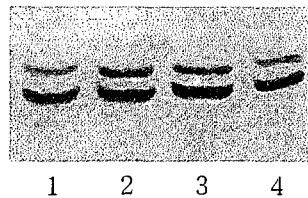


Figure 4. pErk western blot of NIH/3T3-HBx

- 1: Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang)
- 2: control(NIH/3T3-HBx)
- 3: PD98059 5uM
- 4: negative control

(2) Erk western blot

pErk의 western blot이 정확하게 인산화도를 반영하고 있는가를 살펴보기 위해 같은 sample들을 가지고 인산화에 관계없이 전체적인 Erk 양을 측정할 수 있는 Erk western blot을 시행하였다. NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2 양을 측정하였다. 약제는 500μg/ml의 농도로 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였다. Figure 5

에서 볼 수 있듯이 어느 군에서나 Erk의 양이 거의 변화없이 일정함을 알 수 있다.

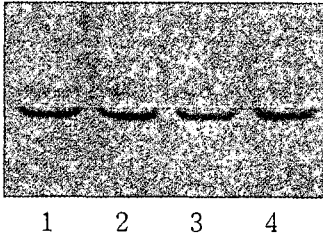


Figure 5. Erk western blot of NIH/3T3-HBx

- 1: Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan tang)
- 2: control(NIH/3T3-HBx)
- 3: PD98059 5uM
- 4: negative control

(3) NIH/3T3의 pErk western blot

위에서 나타난 한약의 pErk의 감소효과, 즉 Erk의 인산화를 감소시킴으로써 세포주기 진행을 억제하는 효과가 HBxAg 특이적으로 작용하는 것인지를 확인하기 위하여 pcDNA-X를 transfection 시키지 않은 NIH/3T3 세포에 위와 마찬가지로 방법으로 시료를 처리하여 pErk의 양을 측정하였으며 그 결과는 Figure 6 과 같다. NIH/3T3 세포들을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 약제는 500µg/ml의 농도로 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였다.

Figure 4와 Figure 6를 비교해 보면, Figure 4에 비하여 Figure 6의 sample들간의 차이가 더 작음을 알 수 있다. 또 Figure 6의 PD98059 처리군 pErk의 양이 큰 변화를 보이고 있다. 따라서, NIH/3T3-HBx에서 PD98059가 pErk의 억제작용을 하지 못한 것은 HBxAg의 길항작용에 의한 것일 가능성을 배제할 수 없다.

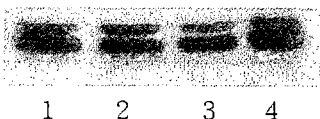
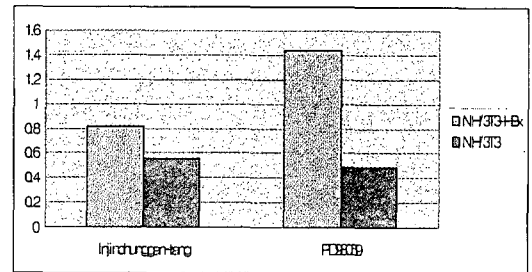


Figure 6. pErk western blot of NIH/3T3

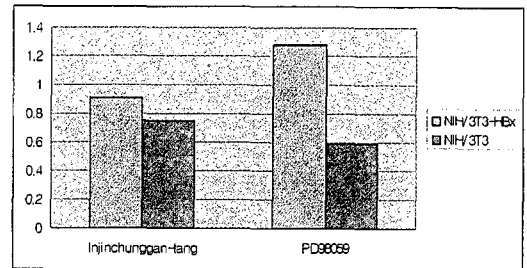
- 1: Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang)
- 2: PD98059 5uM
- 3: PD98059 50uM
- 4: negative control

우리는 이를 정량분석하기 위하여 먼저 Densitometer로 band의 밀도를 측정하고 이 두 자료를 분석하여 아래의 그래프(figure 7)로 나타냈다. 먼저 대조군을 1로 잡고 시료처리군의 양을 대조군에 대한 비율로 나타내어 이 둘을 비교하여 HBxAg 특이적인 Erk 인산화 억제작용을 지니는가를 확인하여 보았다.

아래와 같이,茵陳清肝湯은 HBxAg에 의한 Erk의 인산화를 특이적 억제하는 것으로 사료되었다. 따라서茵陳清肝湯은 HBV로 인한 간암 발생에 효과적인 약재로 선택될 수 있는 가능성을 높게 가지고 있다고 할 수 있다.



A



B

Figure 7. Densitometric difference of pErk levels between NIH/3T3-HBx(former bar) and NIH/3T3(latter bar)

A : Erk1(44kD), B : Erk2(42kD)

concentration : 500µg/ml

values represent relative density of each bands regarding that of control as 1

IV. 고 찰

역학적으로 간암은 아프리카 및 동남아시아 지역에서 흔한 것으로 알려져 있으며 서양권에서도 증가되는 추세에 있다²⁾. 간암(Hepatic tumors)으로 인한 사망자는 전 세계적으로 매년 1,000,000명을 넘는 것으로 추정되어지고 있으며, 특히 우리나라에서는 간암 사망률이 세계 1위를 차지하는 수준이고, 만성간질환이 40-50대 남자 사망원인의 1위를 차지하고 있어 간질환에 대한 대책이 시급한 실정이다¹¹⁾.

한의학적으로 간암은 脹滿, 癥積, 黃疸 등의 개념에 대응되며, 腹痛, 脹滿, 全身無力, 疲勞, 食慾不振, 惡心, 嘔吐, 黃疸, 發熱 등의 증상을 나타내고, 氣血瘀滯와 熱毒內盛 등의證에 해당되어 淸熱利濕, 活血行氣, 扶正祛邪 등의 방법으로 간암을 치료해왔다³⁾. 본 연구는 이러한 한의학적 치료의 현대과학적인 방법으로 이해하기 위한 것이며 이는 한의학적 치료의 신뢰성 획득과 나아가 새로운 치료법 개발을 위해서 반드시 필요한 것이다.

간암의 발생에는 B형 간염바이러스(Hepatitis B Virus, HBV)와 C형 간염바이러스(Hepatitis C Virus, HCV)의 감염과 그 밖의 원인으로 인한 간경화와 만성간염이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다. B형 간염바이러스와 간암과의 관계에 대해서는 그 간에 간염 바이러스의 X 단백질에 의한 암발생이 계속되어 발표되어 왔으며, 최근에는 이 X단백질이 발암유전자(oncogene)의 전사(transcription)를 증가시키는 transactivating factor라는 것이 발표되어 그 가능성을 더욱 높여주고 있다⁸⁾. HBV-X 단백질이 transactivating factor로서의 작용 이외의 암발생 효과를 가지고 있음이 보고되었는데, protein kinase C나 diacylglycerol 등의 second messenger를 이용하여 암 발생 신호를 더욱 복잡하고 광범위하게 세포내로 전달한다는 것이다⁹⁾. HBV-X 단백질은 ras-raf-mitogen-MAP kinase 신호전달체계와 cdk2 등에 작용하여 cell cycle check point control의 균형을

깨뜨린다는 발표가 있었으며, 최근에는 HBV의 X gene이 p53과 같은 암억제유전자의 발현을 억제하는 것으로 알려져 HBV의 간암과의 관계가 더욱 밀접한 것으로 밝혀지고 있다^{10,11)}.

또한 HBV의 pre-S 항원의 축적 또한 간염과 재생과정을 촉진하고 이 과정에서 간암이 유발된다는 보고도 있다¹²⁾. HBV는 증식과정 중에 세포핵의 염색체 안에 integration되는 바이러스이므로 이 과정에서 암 관련 유전자의 발현을 조절하여 암을 발생시킬 수 있다.

HBV의 간암 발생은 위에서 언급한 유전자에 의한 것뿐만 아니라 만성간염이나 간경화와 같은 합병증과도 관련되는데, 이것은 HCV나 다른 간염 발생 요인의 간암 발생 경로이기도 하다. 결절형 세포증식은 간암으로 진행되며 세포 확장, 핵 다형태성, 다핵성 세포 등으로 특징지워지는 간세포의 형성이상으로 간암으로 가는 중간 단계이기도 하다¹³⁾. 뿐만 아니라 60%의 간경화 환자에서 원발성 간세포암이 발견되고 있으며, 간경화와 높은 세포 증식률을 가진 환자는 간암으로 발전할 가능성을 가지고 있다고 보고되어 왔다¹⁴⁾. 간암과 간경화의 관련성은 역학적으로도 증명되어 왔는데, 간세포암 환자 1073례 중 658(61.8%)례가 간경화를 보였다는 보고는 간경화와 간암의 연관을 잘 보여주고 있다²⁾.

간암의 한의학적 치료에 대한 연구는 아직 활발하게 이루어지지 못하고 있는 실정이지만 간암을 유발하는 간염바이러스와 이로 인해 유발된 만성간질환의 치료에 대한 연구는 꾸준히 진행되어왔다. 우¹⁵⁾는 바이러스성 만성 B형 간염 환자를 대상으로 한약을 투여하여 임상증상의 개선, AST, ALT치를 안정화 및 29%에서 HBeAg이 소실되었다고 보고하였다. 김¹⁶⁾ 등은 천연물 치료제가 Interferon과 유사한 치료효과를 나타낸다고 보고하였다. 이¹⁷⁾는 한약물이 실험적으로 유발된 간장해에 대하여 유의한 간보호작용을 나타내었고 담즙분비효능에 대하여도 유의한 효과가 있음을 보고하였다. 車¹⁸⁾는 B형 간염환자를

대상으로 한약을 투여하여 HBeAg 음전률을 보고하였다. 정¹⁹⁾은 anti-HCV 양성인 환자를 대상으로 한약을 투여하여 HCV-RNA가 음전되었다고 보고하였다. 우²⁰⁾는茵陳淸肝湯 복용 환자군에서 PCR을 이용하여 측정된 환자들의 바이러스의 역가가 낮아짐을 보고하였고, ALT, AST 등 血清內 肝酵素値를 正常化시키며 B형 肝炎 바이러스의 複製力과 밀접한 關聯이 있다고 생각되는 HBeAg의 seroconversion에 有意性 있는 效果가 있음이 報告되었다⁶⁾.

본 실험에서 사용된茵陳淸肝湯은 A.D. 200년 경 張⁵⁾이 濕熱黃疸의 치료에 사용한茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고 地榆, 蘿菔子, 靑皮, 砂仁 등을 가미한 처방으로 임상에서 바이러스성 간질환의 치료에 淸熱利濕을 목표로 빈번하게 사용되어 왔다.茵陳淸肝湯은 破血祛瘀, 理氣健脾 燥濕化痰 健胃 化濕和中 補脾溫腎 調經止痛 溫中補陽 緩和 解毒하는 등의 작용이 있는 약물들로 구성되어 있으며²¹⁾ 내용 중의 약물들은 東醫寶鑑에서 五積六聚心腹痛脹二便不利 에 적용하는 것으로 기록되어 있다⁴⁾. 따라서 본 처방은 현대적인 입장에서 복강내 암종에 적용해 볼 수 있을 것으로 판단되었고, 특히 HBV로 인한 간암발생에도 효과적인 것으로 생각되었다.

HepG2.2.15 cell이 배양 중에 10% FBS RPMI1640 배지내에 정상적으로 HBV particle을 방출하는지 확인하기 위해 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포 배양액을 거두어 PCR을 위한 template로 사용하였다. PCR을 시행하고 1% Agarose gel에 loading하여 transilluminator로 확인한 결과, HBsAg(+), HBeAg(+)^{인 환자혈청을 양성 대조군으로 사용한 것과 같은 위치에서 PCR band가 나타나는 것이 확인되었고, 이것으로 HepG2.2.15 cell이 배양 중에 정상적으로 HBV particle을 방출하는 것임이 인정되었다.}

HBV X 유전자의 간암 발생에 한약재가 미치는 영향을 살펴보기 위하여 먼저 모든 시료를 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 1500 μ g/ml의 농도로 48시간 동안 처리한 다음, 세포 증식도

를 측정할 수 있는 MTS-PMS assay를 시행하였다. MTS/PMS assay에서 측정된 formazan product의 OD 값은 세포 증식도와 비례하므로 흡광도의 감소는 곧 세포의 증식이 억제됨을 의미하는 것으로 인정된다. 실험결과茵陳淸肝湯을 투여한 실험군은 투여 농도에 비례하여 흡광도가 유의하게 감소되는 것으로 나타났으며(P<0.001) 이는茵陳淸肝湯이 세포의 증식을 억제하는 효과가 있을 것이라는 가정을 가능하게 하였다.

[3H]-thymidine incorporation assay는 cell cycle 중의 S기에서 일어나는 DNA 복제량을 측정하는 방법으로 3H으로 표지된 thymidine을 세포에 일정시간 처리한 다음, 세포를 녹여 세포 내에 함유된 [3H]-thymidine의 양을 β -counter로 측정하는 방법이다. 본 실험에서는 [3H]-thymidine 10 μ Ci를 세포 분열 한 주기의 시간인 18시간 동안 처리하였으며 β -counter로 측정한 CPM 값은 농도에 비례하여 감소되는 경향을 보였으며 이는 $y=6095.2e^{-0.0012x}$, $R^2=0.8952$ 로 나타나서 유의성있는 감소경향을 보여주었다. 이는茵陳淸肝湯의 투여가 농도에 비례하여 HepG2.2.15 cell의 DNA 복제를 억제한 것으로 인정되는 것이다.

NIH/3T3 fibroblast는 분화(differentiation)되기 이전의 정상 섬유모세포로 분화에 의한 여러 형질에 관련 없이 분열과 증식에 관한 성질을 나타내기 때문에 oncogene의 연구에 흔히 사용되는 세포주이다. 따라서 우리는 이 세포주에 목암연구소의 운영대 박사에게서 수여받은 pcDNA-X를 transfection시킨 NIH/3T3-HBx 세포주를 사용하였고⁷⁾, transfection 방법으로는 Qiagen 사의 Effectene transfection reagent를 사용하였다.

p44 MAP kinase(ERK1)와 p42 MAP kinase(ERK-2)는 현재까지 알려진 MAP kinase family 중 가장 많이 연구되어진 것으로 tyrosine kinase를 활성화시키는 growth factor, protein kinase C activator, phosphatase inhibitor 등 여러 인자들에 의해 활성화된다. 이러한 MAP kinase의 활성화는

threonine과 tyrosine 기의 인산화(phosphorylation)에 의하여 조절되는데 ras-raf 신호 전달 경로나 MEK(MAP kinase kinase)에 의하여 인산화가 조절되는 것으로 알려져 있다²²⁾.

HBx 단백질은 ras를 활성화시키며 tyrosine의 인산화를 통하여 ras-raf-MAP kinase 신호 전달 체계를 활성화시킨다²³⁾. 세포질에서 일어나는 이러한 신호전달은 유전자의 발현을 조절해서 일어나는 것이 아니라 그 보다 훨씬 단기에 유전자의 활성도를 조절하는 인산화에 의한 것이기 때문에 약물을 오랜 시간 처리해서는 그 효과를 뚜렷하게 볼 수 없다. 따라서 우리는 이전의 연구에 기초하여 NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다. 그리고 약물의 처리는 500µg/ml의 농도로 3시간 동안의 serum 처리와 동시에 시행하였다²⁴⁾.

먼저 pcDNA-X를 transfection시킨 대조군과 pcDNA1만을 transfection시킨 음성대조군 사이의 차이를 Figure 4에서 볼 수 있다. 즉, 같은 조건에서 같은 처리를 했음에도 불구하고 NIH/3T3-HBx의 Erk가 훨씬 더 많이 인산화되어 있음을 알 수 있으며, 이는 HBV-X gene이 인산화를 촉진시킨다는 기존의 보고와도 일치되는 결과이다^{10,11)}. 이것은 transfection이 잘 되었음을 보여주고 있다. 그리고 PD98059 처리군에서 pErk의 양이 그다지 변하지 않은 것을 확인할 수 있는데 이는 아래에서 고찰하도록 한다.

그리고 pErk의 wetern blot이 과연 정확하게 인산화도를 반영하고 있는가를 살펴보기 위해 같은 sample들을 가지고 인산화에 관계없이 Erk를 측정할 수 있는 Erk western blot을 시행하였다. NIH/3T3-HBx cell을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 처리한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 양을 측정하였다. 약물의 처리는 3시간 동안의 2% serum 처리와 동시에 시행하였으며 약물은 500µg/ml의 농도로 사용하였다. Figure 5에서 볼 수 있듯

이, Erk의 양이 거의 변화없이 일정함을 알 수 있다. 이는 약제가 세포의 발암유전자 생성에는 아무런 영향을 주지 않고 Erk의 인산화만을 선택적으로 억제하였다는 것으로 해석될 수 있으며, 따라서 茵陳淸肝湯이 암발생을 억제하는 효과를 가지는 것으로 생각된다.

위에서 나타난 한약의 pErk의 감소효과, 즉 Erk의 인산화를 감소시킴으로써 세포주기 진행을 억제하는 효과가 HBxAg 특이적으로 작용하는 것인지를 확인하기 위하여 pcDNA-X를 transfection 시키지 않은 NIH/3T3 세포에 위와 마찬가지로 방법으로 시료를 처리하여 pErk의 양을 측정하였으며 그 결과는 Figure 6. 과 같았다. HBV-X gene을 포함하지 않은 NIH/3T3 세포들을 6시간 동안 serum starvation 시킨 후, 2% serum으로 3시간 동안 자극한 다음, 단백질을 추출하여 Erk1, Erk2의 인산화를 측정하였다.

Figure 4와 Figure 6를 비교해 보면, Figure 4에 비하여 Figure 6의 sample들간의 차이가 더 작음을 알 수 있다. 또 Figure 6의 PD98059 처리군 pErk의 양에는 큰 변화가 보이고 있다. 따라서, NIH/3T3-HBx에서 PD98059가 pErk의 억제작용을 하지 못한 것은 HBxAg의 길항작용에 의한 것일 수도 있다.

우리는 이를 정량분석하기 위하여 먼저 Densitometer로 band의 밀도를 측정하고 이 두 자료를 분석하였는데, 이 결과 茵陳淸肝湯은 HBxAg에 의한 Erk의 인산화를 특이적으로 억제함을 알 수 있다. 이 결과는 앞에서 살펴보았던 DNA 합성 억제 현상에 대한 분자생물학적 기반을 제시해 주는 것으로 茵陳淸肝湯이 HBxAg의 간암 발생을 억제하는데 유의한 약물인 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 茵陳淸肝湯은 MTS/PMS assay 상 간암

세포주 HepG2.2.15의 증식을 억제하는 효과가 있었다.

2. 茵陳清肝湯은 [³H]-thymidine incorporation assay상 간암세포주 HepG2.2.15의 DNA 합성을 억제하는 효과가 있었다.

3. 茵陳清肝湯은 HBV-X gene의 MAP kinase의 인산화를 억제하는 효과가 있었다.

이상의 결과를 볼 때, 茵陳清肝湯은 HBV로 인한 간암발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료되며, 이에 대한 지속적인 연구를 통하여 간암치료에 대한 임상적용 가능성을 넓힐 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement : 이 논문은 한국한의학 연구원에서 시행한 한방치료기술연구개발사업의 연구비 수혜논문입니다. pcDNA-X를 제공해주신 목암연구소의 운영대박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. 통계청, 사망원인 통계연보, 1997.
2. Sheila Sherlock & James Dooley, Diseases of the liver and biliary system, Blackwell science, 531, 1997.
3. 金秉雲, 禹弘楨, 金德鎬 外, 肝系內科學, 서울 : 東洋醫學研究院, 274, 1989.
4. 許浚, 東醫寶鑑, 서울 : 大成文化社, 雜病篇 ; 302, 1992.
5. 張仲景 : 金匱要略, Seoul, 杏林書院, 392-4.37, 1984.
6. 禹弘楨 : 慢性B型肝炎에 대한 茵陳清肝湯의 效果, 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 - 肝臟編 -, 大韓醫師協會, 18~53, 1995.
7. Lee H, Lee YH, Huh YS, Moon H, Yun Y, X-gene product antagonizes the p53-mediated inhibition of hepatitis B virus replication through regulation of the progenomic/core promoter, Journal of biological chemistry, 270(52) ; 31405-12, 1995.
8. Diamantis ID, McGandy CE, Chen TJ, Liaw YF, Gudat F, Bianchi L, Hepatitis X

- gene expression in hepatocellular carcinoma, J. hepatol, 15 ; 400, 1992.
9. Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH, Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signalling pathway, nature, 361(6414) ; 742, 1993.
10. Benn J, Schneider RJ, Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle check point controls, Proc Natl Acad Sci USA, 92(24) ; 11215, 1995.
11. Schaefer S, Seifer M, Grimmsmann T, Fink L, Wenderhold S, Hine MW, Gerlich WH, Properties of tumor suppressor p53 in murine hepatocyte lines transformed by hepatitis B virus X protein, 79(4) ; 767, 1998.
12. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice, Cell, 59 ; 1145, 1989.
13. Anthony PB. Liver cell dysplasia: what is its significance? Hepatology 7 ; 394, 1987.
14. Baker ME et al. Hepatic metastasis: Basic principle and implications for radiologist. Radiology 197 ; 329, 1995.
15. 우홍정, 만성 B형 간염에 대한 인진청간탕의 효과, 제2회 한중학술대회(간장병)논문집, 대한한의사협회, 18, 1995.
16. 김승호, 천연물 이용 간염치료제 개발에 관한 연구, 과학기술처, 1992.
17. 이장훈, 간질환치료제의 효능에 관한 실험적 연구, 제2회 한중학술대회(간장병)논문집, 대한한의사협회, 123, 1995.
18. 車念聰, 病毒性乙型肝炎의辨證論治. 第二次中韓學術研討會 中方論文全輯. 15, 1995.
19. Jong-Chol Cyong, Minoru Furuya, The elimination of HCV in chronic hepatitis C patients by Kampo medicine. The 8th Int'l Congress of Oriental Medicine. 166, 1995.
20. 우홍정, 이장훈, 김영철 외, A study on the therapeutic effect of oriental medicine on hepatitis B, 경희의학, 13(3) ; 298, 1997.
21. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희, 한약임상응용, 서울 : 전통의학연구소.

- 47, 205, 214, 225, 228, 231, 289, 290, 322, 323, 343, 472, 1993.
22. Bird TA, Kyriakis JM, Tyshler L, Gayle M, Milne A, Virca GD, Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein(MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, raf-1, and MAP kinase kinase, *Journal of biological chemistry*, 269(50) ; 31836-44, 1994.
23. Benn J, Schneider RJ, Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a ras, raf, MAP kinase signaling cascade, *Proc. Natl. Acad. SCI. USA.* 91 ; 10350-4, 1994.
24. Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ, The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of ras and nuclear activator of transcription factors, *The EMBO Journal*, 14(19) ; 4747-57, 1995.