

大韓韓方內科學會誌 : 第20卷 第1號

K.I.M.S. Vol 20, No.1, 1999

수종의 한약재가 HepG 2.2.15 Cell의 HBeAg 발현 에 미치는 效果

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실 *

禹弘楨 · 李長勳 · 金榮哲*

ABSTRACT

The Effect of Herbs on Inhibition of HBeAg Production
in HepG2.2.15 Cell line

* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Kyunghee University
Hong-Jung Woo, Jang-Hoon Lee, Young-Chul Kim

Purpose : Hepatitis B virus DNA transfected cell line(HepG2.2.15) was cultured to evaluate the effect of herbs on the expression of HBeAg and the replication of HBV. HepG2.2.15 produces HBV particles as well as viral proteins into cell culture media.

Methods : Extracts of herbs were administered to the cells on the proper concentration. Culture media was collected 48 hours after the herbal administration and HBeAg level in the media was examined by ELISA method. To confirm that the anti-viral effect was not due to direct cytotoxicity of the extracts, normal cell

접수일 : 1999. 6. 28

심사일 : 1999. 7. 15

proliferation was shown by cell counting. And as of the interference in protein synthesis of HepG2.2.15 by herb-extracts, we used the result of study that we performed before by α FP assay using EIA method.

Results & Conclusion : Herb medicines like 地榆(Sanguisorbae Radix) and 覆盆子(R-ubi Fructus) showed significant inhibitory effect on HBeAg expression at P<0.01 and 五味子(Acanthopanax Cortex) at P<0.05. Whereas, though some herbs such as 茜草根(Rubiae Radix), 山楂(Crataegii Fructus), 白芍藥(Paeoniae Radix Alba), and 大黃(Rhei Radix et Rhizoma) showed the tendency to suppress HBeAg, most of them were not significant statistically.

From the above, we could conclude that those herb medicines can be applied to patients effectively and further studies on effective fraction of some herbs are thought to be needed.

Key words : HBV, herb, HepG2.2.15, HBeAg

I. 緒論

전 세계적으로 약 3억명의 사람들이 B형 간염 바이러스를 보유하고 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 동양권 및 아프리카 지역에 만연해 있고, 우리 나라도 B형 간염의 有病率이 높은 지역 중의 하나로서 보건사회적인 문제가 되고 있다¹⁾. 또한 만성 B형 간염이 慢性化 과정을 거치게 되면 肝硬變이나 肝癌으로 傳變될 가능성성이 높아지고 이 경우 治療가 容易하지 않은 難治病이 되어 注意를 要하는 疾患이다²⁾.

韓醫學에서 肝疾患에 대한 内容은 文獻上 主로 黃疸, 脹滿, 積聚 등^{3,4)}에 잘 나타나 있고, 이 중 바이러스性肝炎의 症候는 黃疸^{3,5,6,7,8,9)}에 대한 症候觀察에서 類似性을 찾아볼 수 있다. 黃疸의 原因은 濕熱熏蒸, 寒濕在裏 등이며, 治法으로는 清熱利濕이 根幹이 되고, 이러한 증후의 치료를 위해 많은 治療處方들이 임상에서 활용되어 왔다^{4,5,6)}.

임상에서는 濕熱黃疸에 主藥으로 使用되어 왔던 茜草에 대한 연구가 주로 이루어져왔으나, 최근에는 항바이러스효과에 대한 검토가 활발하게 진행되고 있는 실정이다. 저자 등은 이미 茜草淸肝湯 등의 복합제에 대한 연구에서 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine amino-transferase) 등 血清內 肝酵素值를 正常化시키며 B형 肝炎 바이러스의 增殖과 밀접한 關聯이 있다고 생각되는 HBeAg의 seroconversion에 有意性 있는 效果가 있음이 報告한 바 있다¹⁰⁾. 그러나 HBV(hepatitis B virus)는 human, duck, ground squirrel등의 宿主 내에서만 肝炎을 일으키는 것으로 알려져 있으며^{11,12)}, 實驗動物을 이용한 研究가 容易하지 않아 바이러스성 肝炎에 대한 韓藥의 治療機轉을 直接 觀察하지 못하고, 藥物損傷性肝炎, 알코올성 肝炎, MHV-2로 肝障礙를 유발한 실험모델 등에서 肝障碍에 대한 韓藥의 治療效果를 觀察해 온 實情이다^{13,14)}.

本 實驗에 使用한 HepG2.2.15 cell line은 human hepatoma cell에 HBV-DNA를

integration시킨 cell line으로서 replication하면서 HBV particle을 media내로放出하며 바이러스蛋白인 HBsAg, HBeAg등이 media내에 함께放出된다^[1,12]. 따라서 HBV抗原中 바이러스의活動性과密接한聯關係이 있는 HBeAg의放出에 대한韓藥의抑制有無를觀察할수 있다. HBeAg은 B型肝炎 바이러스의 core를 이루는蛋白의 일종으로 感染初期부터患者의血清内에觀察되며 HBeAg이血中内에 관찰되는 것은 HBV의活潑한增殖狀態를意味하고 있다^[15].

本研究에서는 이미 발표된 복합제에 대한 연구결과를 계속하여^[16] 이러한 HBV producing cell line에 단미약재를處理하며肝炎 바이러스蛋白의抑制有無를觀察確認함으로써韓藥材가B型肝炎 바이러스의複製 및 바이러스蛋白의발현에 미치는影響을 밝히고자하였다.

II. 對象 및 方法

1. Materials and Methods

1) 韓藥

본 실험에 사용한藥劑는慶熙大學校附屬韓方病院에서購入하여嚴選한 것을 사용하였으며 그 내용은 다음과 같다(Table 1).

2) cell line

Human hepatoma cell line인 HepG2 cell genome에 HBV DNA가 integration되어 HBV particle을放出해내는 HepG2.2.15. cell line을 실험에 사용하였다. 細胞倍養培地로는 MEM培地90%에 Fetus bovine serum 10%를 혼합하여 사용하였다. HBV遺傳子를 유지시키기 위해 Geneticin(G418)을 200 μ g/ml의 농도로 media내에첨가하였다^[17].

Table 1. Each herbs used in this study

약물(Herbs)	생약명(Botanical name)
地榆	Sanguisorbae Radix
茜草根	Rubiae Radix
烏犀角	Bubalis Bubalis
覆盆子	Rubi Fructus
白芍藥	Paeoniae Radix Alba
大黃	Rhei Radix et Rhizoma
五味子	Acanthopanaxis Cortex
厚朴	Magnoliae Cortex
山楂	Crataegii Fructus
桂皮	Cinnamomi Ramulus
麥芽	Hordei Fructus Germiniatus
甘草	Glycyrrhizae Radix

2. 方法

① Herbal Medicine Powder Preparation

1) 藥劑의抽出 : 개별약재를 각각 50g씩 round flask에 넣고 냉각기를 부착한 상태에서 증류수를 가하여 3시간 동안 2회還流抽出한 후綿으로濾過하여濾液을 80°C 물증탕 위에서 감압농축하였다.

2) 凍結乾燥 : 상기의 추출약물을 동결건조기(Christ LDC-A, Alpha 1/4, Germany)를 이용하여동결건조하여 건조추출물을 얻었다.

3) 얻어진 건조분말 엑기스를 적당한 농도로증류수에 희석한 후 잡질을 제거하기 위하여40000rpm으로 30분간 원심분리하여上清液만을취하고, 이것을 syringe filter로 멀균하여 적정농도로 희석하여 세포에 처리하였다.

② Cell culture

human hepatoma cell line인 HepG2 cell genome에 HBV DNA가 integration된 HepG2.2.15. cell line을 실험에 사용하였다. MEM배지90%에 Fetus Bovine Serum 10%를 혼합하여세포배양배지로 사용하였다. HBV遺傳子를

유지시키기 위해 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 Genetin(G418)의 존재하에 37°C , CO_2 incubator에서 배양하였다.

③ Media내 HBV DNA 確認

HepG2.2.15 cell의 HBV particle 放出을 확인하기 위해 변이가 적다고 알려진 core region에 상응하는 primers(bioneer사 제작)를 이용하여 first PCR(polymerase chain reaction) 및 nested PCR을 시행하였다. NaOH법으로 HBV DNA를 抽出하였는데, 1N NaOH $100\mu\text{l}$ 을 $100\mu\text{l}$ 의 倍養액에 가하여 HBV DNA를 추출하였으며, pH를 맞추기 위해 1N HCl $100\mu\text{l}$ 을 가하여 중화하여 PCR solution으로 사용하였다. PCR mixture는 bioneer사에서 구입 사용하였으며, 1회에는 96°C 에서 2분간 denaturation, 54°C 에서 60초간 annealing, 74°C 에서 60초간 extension하였으며 이후 34 cycles을 增幅하였고, 마지막 cycle에서는 extention time을 5분간으로 하였다. first PCR 후 product를 곧바로 nested PCR의 template로 사용하여 nested PCR을 시행하였다. 이렇게 하여 생긴 amplified DNA product를 1% Agarose(0.5g Agarose, 0.5X TBE buffer, 2ul EtBr을 섞은 후 electrophoresis cast에 부어 굳힘)에서 running하여 transilluminator로 확인하였다.

④ 實驗設計

6 well plate에 HepG2.2.15 cell을 각 well당 1×10^5 이 되도록 조정하여 seeding하였으며 media의 양은 well 당 3ml 씩으로 하였다. 각 plate를 모두 같은 조건으로 48 hours 동안 37°C , CO_2 incubator 안에서 culture한 후 media를 새로 갈아주고 6 well 각각에 농도가 $0\mu\text{g}/\text{ml}$, $25\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 6 group으로 나누어 멀균된 韓藥으로 처리하였다. 이때 HBV 유전자를 유지시키기 위해 G418을 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가해 주었다. 한약처리 후 48시간 후에 HBeAg assay를

위해 media는 따로 취하여 -70°C refrigerator에서 보관하였으며, trypsin으로 남은 cell을 harvest하였다.

⑤ Cell counting

韓藥이 cell viability에 미치는 영향을 관찰하기 위해 48시간 동안 한약처리 후 media를 harvest하여 HBeAg assay를 위해 -70°C refrigerator에서 보관하고, 남은 cell에는 PBS(p-osphate buffered saline)로 3회 세척한 후 Trypsin을 각각 well마다 0.5ml 씩 가하여 cell을 완전히 harvest한 후 hematocytometer를 이용하여 cell을 counting하였다.

⑥ HBeAg ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

약재처리 후 취한 media를 각각 1.5ml eppendorf tube에 담아 -70°C refrigerator에 보관하였다가 cell counting이 끝난 후 media를 다시 녹여서 1200 rpm으로 5분간 원심분리하여 잡질을 제거하였다. 상층에서 $100\mu\text{l}$ 를 따서 HBeAg ELISA kit(녹십자, 한국)를 이용하여 HBeAg에 Anti-HBe/HRP 접합 체액을 반응시킨 후 TBE를 가하고 파장 450nm , 참고파장 650nm 로 ELISA reader를 이용하여 O.D.(optic density)를 측정하였다.

⑦ α FP EIA(enzyme immunoassay)

media를 1200rpm으로 5분간 원심분리하여 잡질을 제거하고 serum free MEM media로 10배 희석시킨 후 $20\mu\text{l}$ 을 따서 α FP EIA kit(녹십자, 한국)를 이용하여 파장 450nm , 참고파장 650nm 로 ELISA reader를 이용하여 O.D.를 측정하게 된다. 본 실험에서는 본 교실에서 이미 보고한 인진청간탕의 결과를 바탕으로 본 실험에 운용하였다.

⑧ Statistical analysis

실험은 HBeAg량과 세포수를 변수로 하여 3 groups로 하였으며 모든 실험결과는 평균치와 표준편차를 사용하여 나타내었고, 각 군간의 비교는 처리군에 따른 차이를 확인하기 위하여 SPSS 프로그램을 사용하여 이원 배치 분산분석(Two way-ANOVA)을 시행하였다.

III. 結 果

1. HepG2.2.15 cell의 Hepatitis B Virus Producing Ability 確認

HepG2.2.15 cell이 배양 중에 10% FBS MEM 배지내에 정상적으로 HBV particle을 방출하는지 확인하기 위해 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포 배양液을 거두어 PCR을 위한 template로 사용하였다. First PCR 및 Nested PCR을 시행하고 1% Agarose gel에 loading하여 transilluminator로 확인한 결과, 양성 대조군(B형 간염환자의 혈청)과 같은 위치에서 PCR band가 나타나는 것이 확인되었고, 이것으로 HepG2.2.15 cell이 배양 중에 정상적으로 HBV particle을 방출하는 것임이 인정되었다.



Fig 1. The serum of HBV positive patient(Left) and the media of HepG2.2.15 cell line(Right) were selected for PCR. Two bands are shown at the same level(3.2Kb) and it means that the HepG2.2.15 cell line produces HBV particle.

2. 실험약물의 농도설정

본 교실에서 이미 발표한 바 있는 복합처방에

대한 실험결과를 바탕으로 하여 농도를 25ug/ml, 50ug/ml로 정하였다^[16].

3. 細胞增殖에 미치는 影響

한약재가 세포의 viability에 미치는 영향을 확인하기 위해 6 well plate에 각 well 당 1×10^5 으로 세포를 seeding한 후 48시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 culture하였다. 각 well에 cell이 잘 attach된 것을 확인한 후 개별약재의 동결건조 powder를 각각 0μg/ml, 25μg/ml, 50μg /ml의 농도로 처리하였으며, 48시간 후에 HBeAg의 방출정도를 측정하기 위해 cell media를 채취

Table 2a. Cell counting of HepG 2.2.15 48 hours after administration of herbs

Botanical Name	Concentr ation	Mean	SD	Concentration		
				Contr ol	25μg/ml	50μg/ml
Sanguisorbae	Control	1.92	0.25	0.00	0.03	0.09
	25μg/ml	1.95	0.23	-0.03	0.00	0.05
	50μg/ml	2.00	0.16	-0.09	-0.05	0.00
Acanthopanax	Control	3.40	0.42	0.00	0.16	-0.22
	25μg/ml	3.55	0.57	-0.16	0.00	-0.38
	50μg/ml	3.18	0.35	0.22	0.38	0.00
Cortex (五味子)	Control	2.64	0.18	0.00	0.64**	-0.25
	25μg/ml	3.28	0.36	-0.64**	0.00	-0.39
	50μg/ml	2.89	0.27	-0.25	0.39*	0.00
Bubalus Radix (烏犀角)	Control	4.25	0.51	0.00	0.25	-0.35
	25μg/ml	4.50	0.73	-0.25	0.00	-0.59
	50μg/ml	3.90	0.56	0.35	0.59	0.00
Rubiae Radix (茜草根)	Control	3.48	0.30	0.00	-0.14	0.25
	25μg/ml	3.34	0.30	0.14	0.00	0.39
	50μg/ml	3.73	0.64	-0.25	-0.39	0.00
Crataegii Fructus (山楂)	Control	3.22	0.50	0.00	-0.03	-0.03
	25μg/ml	3.18	0.19	0.03	0.00	0.01
	50μg/ml	3.19	0.23	0.03	-0.01	0.00

Mean value represents cell number X 10⁵ / ml.

** : p<0.01 * : p<0.05

하여 따로 보관해 두고, 남은 cell은 trypsin을 처리하여 harvest하고 hematocytometer를 이용하여 counting하였다. 실험군 중에서 烏犀角을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 세포수가 25 μ g/ml 및 50 μ g/ml 실험군에서 모두 증가되는 경향을 보였고(각각 $p<0.01$, $p<0.05$), 麦芽 大黃투여군에서는 50 μ g/ml 투여군에서 감소하는 경향을 보였으나($p<0.05$) 대다수의 한약재에서는 변동폭에 통계적인 유의성은 없었다 (Table 2a,2b).

Table 2b. Cell counting of HepG 2.2.15 48 hours after administration of herbs

Botanical Name	Concentration	Mean	SD	Concentration		
				Control	25 μ g/ml	50 μ g/ml
Paeoniae Radix Alba(白芍藥)	Control	5.43	1.42	0.00	-0.62	-0.80
	25 μ g/ml	4.81	1.26	0.62	0.00	-0.18
	50 μ g/ml	4.63	1.31	0.80	0.18	0.00
Rhei Radix et Rhizoma(大黃)	Control	6.68	0.90	0.00	-0.71	-1.58'
	25 μ g/ml	5.97	0.86	0.71	0.00	-0.87
	50 μ g/ml	5.10	0.83	1.58'	0.87	0.00
Magnoliae Cortex(厚朴)	Control	3.56	0.39	0.00	-0.07	-0.79'
	25 μ g/ml	3.49	0.41	0.07	0.00	-0.72'
	50 μ g/ml	2.77	0.36	0.79'	0.72'	0.00
Glycyrrhizae Radix(甘草)	Control	5.23	0.39	0.00	-0.13	-0.38
	25 μ g/ml	5.10	0.40	0.13	0.00	-0.25
	50 μ g/ml	4.85	0.28	0.38	0.25	0.00
Cinnamomi Ramulus(桂皮)	Control	4.46	0.44	0.00	-0.29	-0.20
	25 μ g/ml	4.17	0.24	0.29	0.00	0.10
	50 μ g/ml	4.26	0.30	0.20	-0.10	0.00
Hordei Fructus Cerminatus(麥芽)	Control	7.03	0.40	0.00	0.26	0.42
	25 μ g/ml	7.28	0.50	-0.26	0.00	0.16
	50 μ g/ml	7.44	0.69	-0.42	-0.16	0.00

Mean value represents cell number X 10³ / ml.

4. HBV의 HBeAg 발현에 미치는 影響

한약재 투여 후의 바이러스 증식 억제효과를 관찰하기 위해서 Hepatitis B virus 단백 중 바이러스 복제 활동과 가장 밀접하게 연관되어 있다고 여겨지는 HBeAg의 media 내로의 방출에 대한 억제효과를 관찰하였다. 6 well plate에 1×10^5 으로 세포를 seeding한 후 48시간 동안 37°C, CO₂ incubator에서 culture하여 cell을 잘 attach시키고, 각각의 powder를 0 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도로 처리한 후, 다시 48시간 동안

Table 3a. The effect of Herbs on HBeAg Production of HepG2.2.15

Botanical Name	Concentration	Mean O.D.	SD	Concentration		
				Control	25 μ g/ml	50 μ g/ml
Sanguisorbae Radix(地榆)	Control	1.70	0.14	0.00	-0.32'	-0.48''
	25 μ g/ml	1.38	0.15	0.32''	0.00	-0.16
	50 μ g/ml	1.22	0.13	0.48''	0.16	0.00
Acanthopanax Cortex (五味子)	Control	1.80	0.06	0.00	-0.10	-0.20'
	25 μ g/ml	1.70	0.11	0.10	0.00	-0.10
	50 μ g/ml	1.60	0.11	0.20'	0.10	0.00
Bubalus Bubalis (烏犀角)	Control	1.24	0.02	0.00	0.04	.37'
	25 μ g/ml	1.28	0.16	-0.04	0.00	0.33'
	50 μ g/ml	1.61	0.27	-0.37'	-0.33'	0.00
Rubiae Radix (茜草根)	Control	2.43	0.08	0.00	0.18	-0.19
	25 μ g/ml	2.61	0.36	-0.18	0.00	-0.37
	50 μ g/ml	2.24	0.10	0.19	0.37	0.00
Crataegii Fructus (山楂)	Control	1.40	0.04	0.00	-0.03	-0.10
	25 μ g/ml	1.47	0.21	0.03	0.00	-0.07
	50 μ g/ml	1.30	0.10	0.10	0.07	0.00
Rubi Fructus (覆盆子)	Control	1.50	0.24	0.00	-0.87''	-0.96''
	25 μ g/ml	0.63	0.09	0.87''	0.00	-0.09
	50 μ g/ml	0.54	0.02	0.96''	0.09	0.00

O.D. : optic density

** : $p<0.01$

* : $p<0.05$

37°C, CO₂ incubator에서 culture하여 그培養液을 각각 채취하여 HBeAg을 ELISA법을 이용하여 O.D.(optic density, 흡광도)를 측정하였다. 地榆, 五味子, 茜草根, 山楂, 覆盆子, 白芍藥, 大黃, 麥芽 등의 약물들이 HBeAg의 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 이중에서 地榆과 覆盆子 처리군은 25μg/ml, 50μg/ml의 농도에서 모두 유의성 있는 HBeAg 발현량 감소효과를 보였으며 ($p<0.01$), 五味子 처리군은 50μg/ml의 농도에서 유의성 있는 HBeAg 발현량 감소효과를 보였다($p<0.05$). 이러한 소견은 농도의존적인 경향을 나타내보였다. 기타 茜草根, 山楂, 白芍藥, 大黃, 麥芽 등의 약재들에 있어서는 HBeAg의 발현량을 부분적으로 억제하는 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 유의성은 없는 것으로 나타났으며, 生甘草 처리군에 있어서는 발현량이 증가되는 것으로 나타났다 (Table 3a, 3b).

IV. 考 察

세계적으로 B型肝炎을 앓고 있는 인구는 약 3억에 이르고 있고, 특히 동남아시아 및 아프리카 지역이 유병률이 높은 지역으로 보고되고 있다. 동남아시아와 아프리카 지역은 HBV 保有率이 10~15% 정도에 달하는 것으로 알려져 있고, 또한 B형간염은 만성화되는 비율이 다른 질병에 비하여 비교적 높고 慢性肝疾患으로 인한 死亡率도 높은 상태에 있어서 이들 지역에 있어서 높은 B형간염바이러스 보유율은 중요한 公衆保健問題로 자리잡고 있는 실정에 있다. 최근 보고에 의하면 우리 나라에서 B형간염바이러스 보유율이 7%에 달하고 있고, 慢性肝疾患으로 인한 死亡이 전체 주요 死亡原因 중 5위를 차지하고 있으며, 주로 40~50대의 사회적으로 왕성한 활동기에 발생한다는 점에서 사회적으로 중요한 문제로 되고 있는 실정이며, 특히 肝癌으로 인한 사망은 남녀 공히

Table 3b. The effect of Herbs on HBeAg Production of HepG2.15

Botanical Name	Concentration	Mean O.D.	SD	Concentration		
				Control	25μg/ml	50μg/ml
Paeoniae Radix Alba (白芍藥)	Control	1.13	0.37	0.00	-0.07	0.10
	25μg/ml	1.06	0.52	0.07	0.00	0.17
	50μg/ml	1.23	0.45	-0.10	-0.17	0.00
Rhei Radix et Rhizoma (大黃)	Control	1.26	0.09	0.00	0.06	-0.11
	25μg/ml	1.31	0.15	-0.06	0.00	-0.17
	50μg/ml	1.15	0.16	0.11	0.17	0.00
Magnoliae Cortex (厚朴)	Control	0.42	0.02	0.00	-0.01	0.02
	25μg/ml	0.41	0.03	0.01	0.00	0.03
	50μg/ml	0.44	0.03	-0.02	-0.03	0.00
Glycyrrhiza Radix (甘草)	Control	1.48	0.03	0.00	0.06	0.24"
	25μg/ml	1.54	0.14	-0.06	0.00	0.19'
	50μg/ml	1.73	0.14	-0.24"	-0.19*	0.00
Cinnamomi Ramulus (桂皮)	Control	1.73	0.05	0.00	0.04	0.04
	25μg/ml	1.76	0.08	-0.04	0.00	-0.00
	50μg/ml	1.76	0.09	-0.04	-0.00	0.00
Hordei Fructus Germinatus (麥芽)	Control	1.26	0.10	0.00	-0.05	-0.02
	25μg/ml	1.21	0.05	0.05	0.00	0.04
	50μg/ml	1.24	0.07	0.02	-0.04	0.00

O.D. : optic density

** : $p<0.01$

* : $p<0.05$

세계에서 가장 높은 수준을 나타내고 있어서 B형 간염의 조기치료의 중요성을 더해주고 있다¹⁾.

韓醫學에서 肝疾患에 대한 관찰 및 연구는 주로 黃疸, 脹滿, 積聚 등의 症候에서 觀察하여 왔으며^{4,7)}, 바이러스性 肝疾患과 유사한 기록은 黃疸과 脹滿의 症候에서 잘 나타나고 있다⁸⁾. 특히 黃疸의 원인으로는 濕熱熏蒸, 寒濕在裏 등을 들고 있으며, 그 治法은 清熱利濕이 가장 기본이 되고, 證候와 病程에 따라 健脾和胃, 清血祛瘀, 利水逐水 등의 补助의 治法을併用하고 있으며, 清熱利濕의 代表의 處方은 茵陳五苓散이 쓰여왔다⁴⁾.

현재 임상에서는 A.D. 200餘年頃 張^{5,6)}이 濕熱 黃疸의 치료에 사용한 茵陳五苓散에 단미약재를

加減한 方劑들을 위주로 바이러스성 慢性肝疾患의 治療에 清熱利濕을 目標로 頻繁하게 활용하고 있다. 간염치료의 대표적인 방제인 茵陳淸肝湯에 대한 研究로는 金¹³⁾이 마우스肝炎바이러스로 誘發된 電激性肝炎의 生存率을 20%에서 53%로 높이는 效果가 있다고 하였고, 禹¹⁰⁾가 慢性B型肝炎 患者에 對한 臨床研究를 通하여 茵陳淸肝湯이 血清學的 檢查에서 AST, ALT 等에 對한 好轉率이 74%에 達하였으며, 追跡可能한 患者 중의 29%와 恢復된 患者의 63%에서 HBeAg이 陰轉되었고, 거의 모든 臨床症狀의 好轉이 있었음을 報告하였다. 金¹⁸⁾은 茵陳淸肝湯의 安全性에 관한 연구에서 급성, 아급성, 만성 경구독성 및 어떠한 부작용도 나타내지 않았다고 報告하였으며, 姜¹¹⁾은 茵陳淸肝湯 加味方이 마우스간염바이러스와 수침스트레스로 유발한 마우스이 肝硬變症에 있어 肝機能改善 및 肝損傷恢復에 有意한 效果가 있다고 報告하였고, 朴¹⁹⁾은 茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞에 대한 毒性을 막고 외부자극에 의한 細胞死亡을 억제하여 肝機能을 保護하는 기능이 있다고 報告하였다.

현대적인 의미에 있어서 B형간염의 가장 기본적인 원인으로 인정되는 B형간염바이러스의 増殖에 대하여 그 과정을 얼마나 抑制하는지에 대한 연구는 韓藥材의 B형간염치료에 있어서 대단히 중요한 관점을 堅持하고 있는 것이다. B형 바이러스성 간염의 治療는 免疫機能의 活性화와 밀접한 관계가 있다. 體液性免疫 및 細胞性免疫의 活性화에 의한 感染細胞의 除去, 血清 내 바이러스의 除去에 따른 바이러스수의 감소가 治療의 先行 要因이다^{12,20)}. 그러나 인체 내에 바이러스수가 너무 많거나, 小兒期의 감염시에는 인체의 免疫的 寬容 때문에 바이러스의 除去가 效果的으로遂行되지 않는다. 바이러스의 감염 緩解를 위해서는 바이러스 수의 감소가 필수적이며 서양의학적으로는 interferon 및 antiviral agent가 이러한 목적으로 활용되고 있다^{12,21)}. 현재까지 복합제재의 간염치료효과의 측면에 있어서는 생체 내에서의 效能이 다양한 방면을 통하여 인정되어 왔지만^{10,18)}, 어떤

한 약재가 보다 실질적인 效果를 가지는지에 대한 報告는 아직 부족한 실정이다.

이에 본 실험에서는 지금까지 활용되어 온 약재 및 문헌고찰을 통해 선정된 약재들을 선택하여 HepG2.2.15 cell line에 처리하여 B형 간염 바이러스 단백의 발현 억제에 대해 考察하였다.

한약재가 세포의 活性度에 미치는 영향을 보기 위하여 우선 약재를 처리한 후 cell count 상에서의 변화를 관찰하였다. 복합제재인 茵陳淸肝湯을 투여한 기존의 실험에서 茵陳淸肝湯의 투여가 시험관 내에서 cell 수를 감소시키지 않았고, 또한 동물실험을 통해서도 인진청간탕이 간세포 손상을 억제하는데 있어서 효과적이며⁴⁾, 또한 세포주기의 활성에 미치는 效果와 聯關지어 생각해 볼 때¹⁹⁾, 茵陳淸肝湯은 cell apoptosis를 抑制하고 regeneration signal을 促進할 可能성이 있는 것으로 인정되었으며, 본 실험의 결과에서도 전반적으로는 茵陳淸肝湯에서와 유사한 결과를 얻을 것으로 사료되는 바이었다. 실험군 중 烏犀角을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 세포수가 25ug/ml 및 50ug/ml 실험군에서 모두 증가되는 경향을 보였고(각각 p<0.01, p<0.05), 麥芽 大黃투여군에서는 50ug/ml 농도에서 감소하는 경향을 보였다(p<0.05). 地榆, 甘草 등에서 세포수가 약재를 처리하지 않은 대조군에 비하여 증가하여 나타났으나 통계적 유의성은 없었고, 기타의 다른 단미 약재들에서도 약간의 증가하는 경향 내지 감소하는 경향이 혼재하여 나타났으나, 이 역시 유의성은 없었다.

본 실험에 사용된 약재 중 상당부분이 포함된 복합제인 茵陳淸肝湯이 HBeAg의 발현을 억제하는 것이 단백질의 합성을 억제하여서 생기는 결과가 아니라는 기존의 보고와 본 실험에서 사용된 cell count 상의 결과에서 보인 내용이 서로 유사성이 있어서, 본 실험에서는 기존의 보고내용을 참고로 본 실험을 진행하였다¹⁶⁾.

HBeAg은 soluble protein의 일종으로 HBV의 급성감염기에서 HBsAg이 검출된 뒤 얼마되지 않

는 잠복기의 상태에서부터 발견되는 것이다. HBeAg의 존재는 virus의 증식과 감염도에 대한 임상적인 지표로서 자주 활용되고 있는 단백질이며 혈청내에서 3개월 이상 양성으로 유지될 때에는 만성화의 경향성을 예고해주는 지표로도 활용되고 있다. 따라서 HBeAg의 소실 내지 감소는 바이러스 증식이나 감염도의 감소를 나타내 주는 것으로 인정되며, 임상에서도 간조직검사를 통한 간염의 활동성 또는 지속성의 판정을 일정부분 대체해주는 효과적인 지표로도 활용되고 있다. 본 실험에서는 6 well plate에 seeding 한 Hep G2.2.15 cell line에 각 단미약재를 각각 0ug/ml, 25ug/ml, 50ug/ml의 농도로 처리하여 HBeAg의 양을 ELISA법을 이용하여 관찰하였다. 실험결과 地榆, 五味子, 茜草根, 山楂, 覆盆子, 白芍藥, 大黃, 麥芽 등의 약물들이 HBeAg의 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 이중에서 地榆와 覆盆子 처리군은 25 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도에서 모두 유의성 있는 HBeAg 발현량 감소효과를 보였으며($p<0.01$), 五味子 처리군은 50 μ g/ml의 농도에서 유의성 있는 HBeAg 발현량 감소효과를 보였다($p<0.05$). 또한 이러한 소견은 농도의존적인 경향을 나타내보였다. 茜草根, 山楂, 白芍藥, 大黃, 麥芽 등의 약재들에 있어서는 HBeAg의 발현량을 부분적으로 억제하는 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 유의성은 없는 것으로 나타났으며, 甘草 처리군에 있어서는 발현량의 오히려 증가되는 것으로 나타났다. 특히 甘草의 경우 세포수의 측정에 있어서도 증가된 경향을 보였으며, HBeAg의 발현량에 있어서도 증가된 것을 고려할 때, 임상에서의 활용에 있어서는 기타 다른 간세포에 대한 직접적인 보호작용 등을 고려하여 취사선택에 대한 판단을 하여야 할 것으로 사료된다. 따라서 상기의 결과를 바탕으로 地榆와 覆盆子에 대하여는 보다 심도있는 연구의 진행을 통하여 약물의 유효성분 및 보다 효과적인 새로운 형태의 치료제 개발에 대한 연구도 필요할 것으로 사료되었다. 또한 오미자에 대하여는 임상활용을 더욱 적극적으로 고려할 필요가 있

을 것이며, 기타 다른 茜草根, 山楂, 麥芽, 白芍藥, 大黃 등의 약재들에 대하여도 한의학적 이론에 배치되지 않는 범위 내에서 임상에서의 활용도를 높여갈 수 있을 것으로 판단되었다.

반면에 본 실험과 유사한 기존의 논문에 나타난 결과 중에서는 조²²⁾ 등이 大黃, 桂皮, 茵陳, 詞子, 覆盆子, 倒生根 등에서 항HBV효과를 보이는 것으로 보고하였는데, 大黃, 桂皮 등에 있어서의 결과의 차이점은 약재의 투여용량에 있어서의 차이가 결과의 차이에 대한 일부 원인으로 작용하였을 가능성을 생각할 수 있고, 또한 일부 약물에서 일정농도 이상 투여하였을 때 세포독성의 영향으로 인한 결과의 오차에 대하여도 충분한 검토가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과에서, 본 실험에 사용된 한약재들은 HepG2.2.15 cell line에 대하여 細胞의增殖과代謝過程에는 아무런抑制的인影響을 미치지 않았고, 일부 약재들은 cell line 내에 integration되어있는 HBV가放出하는 HBeAg에 대하여抑制하는效果를 나타내었다. 따라서 현재 한방임상에서 바이러스성 만성간염의 치료에 활용되고 있는 처방들에 본 실험에서 효과적인 것으로 나타난 수종의 단미약재들을 포함하는 새로운 형태의 한약처방의 구성이 임상에서 보다 효과적으로 활용될 수 있을 것이라는 가능성을 보여주는 계기가 되었다고 여겨진다. 또한 나아가 몇가지 효과적인 약물들의 분획별 약효를 검색하여서 보다나은 효과를 가진 새로운 물질을 개발하여 B형간염 치료에 공헌할 수 있을 것으로 사료된다.

그러나, 이러한 본 연구의 궁극적인 목표에 도달하기 위해서 다음의 두가지가 확인되어야 할 것이다.

한약의 의한 항원량의 감소가 바이러스의 증식 억제에 의한 것인지 혹은 항원의 전사, 번역의 억제에 의한 것인지를 연구할 필요가 있다. 이는 B형 간염 치료에 활용되고 있는 한약의 효능을 분자생물학적 수준에서 규명하기 위한 작업이며 한약 각각의 효능을 명확히하여 임상에 좀더 정확히

게 활용하기 위한 전제조건이 된다. 이러한 확인들은 northern blot analysis, southern blot analysis 등의 방법으로 확인할 수 있으며 poly-merase activity assay 등의 방법으로도 확인할 수 있다.

두 번째로 한약 중에 효능을 가지는 분획과 유효성분을 찾아 그 화학적 구조를 밝히는 일이다. 이는 약물의 경구투여로 유효성분이 표적기관에 도달할 수 있는지, 부작용은 어떤 것들이 있는지, 약물의 약리작용은 어떤 것인지를 밝히는 작업이며 B형 간염 치료제 개발을 위한 핵심적인 작업이기도 하다.

위의 두가지 사실을 밝혀내는 일은, 한약물의 약리를 과학적으로 증명하여 한의학적 이론 발전에 기여할 수 있을 뿐만 아니라, 새로운 바이러스 증식 억제제를 개발하여 치료의학의 발전에 커다란 역할을 담당할 수 있으리라 생각된다.

V. 結 果

한약재가 B型肝炎 바이러스 增殖 抑制에 미치는 影響을 관찰하기 위해 HBV-DNA가 integ ration되어 있는 HepG2.2.15 cell line에 藥劑를 處理하고 PCR, cell count, ELISA 등을 施行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. HepG2.2.15 cell을 MEM 배지로 48시간 培養한 결과 培養液 내에서 HBV-DNA가 PCR법에 의해 확인되었다.

2. Cell counting에 있어서, 烏犀角을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 25 μ g/ml 및 50 μ g/ml 실험군에서 모두 증가되는 경향을 보였고(각각 p<0.01, p<0.05), 麥芽 大黃투여군에서는 50 μ g/ml 농도에서 감소하는 경향을 보였다(각각 p<0.05). 기타의 다른 단미 약재들에서도 약간의 증가하는 경향 내지 감소하는 경향이 혼재하여

나타났으나 유의성은 없었다.

3. 地榆와 覆盆子 처리군은 25 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도에서 모두 유의성있는 HBeAg 발현량 감소효과를 보였으며(p<0.01), 五味子 처리군은 50 μ g/ml의 농도에서 유의성있는 HBeAg 발현량 감소효과를 보였다(p<0.05). 또한 이러한 소견은 농도의존적인 경향을 나타내보았다

4. 薜草根, 山楂, 白芍藥, 大黃, 麥芽 등의 약재들에 있어서는 HBeAg의 발현량을 부분적으로 억제하는 경향을 보이기는 하였으나 통계적인 유의성은 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서, 본 실험에 사용된 한약재들은 HepG2.2.15 cell line에 대하여 細胞의 增殖과 代謝過程에는 아무런 抑制的의 影響을 미치지 않았고, 일부 약재들은 cell line 내에 integration 되어있는 HBV가 放出하는 HBeAg에 대하여 抑制하는 效果를 나타내었다. 따라서 기존에 임상에서 활용되는 처방에 가감하여 운용이 가능할 것으로 생각되며, 나아가 새로운 치료제의 개발도 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements

* This study was supported by research funds of the Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea.

* This study was done at the Laboratory of Immunology in Kyung Hee Medical Center

* We thank Changeun Park for his great help in doing this study.

IV. 參 考 文 獻

1. 統計廳, 95年度 死亡原因統計結果, 서울 : 1997.
2. Basley et al, Epidemiology of Hepat

- o-cellular Carcinoma and Liver Cancer, 1984, 209~224.
3. 姜京兌, 茵陳清肝湯加味方의 實驗的 흰쥐의 肝硬變症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1997.
 4. 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.
 5. 張仲景, 仲景全書, 서울 : 大星文化社, 1984 ; 225,240,249,250,408,411.
 6. 張仲景, 金匱要略, 서울 : 杏林書院, 1984 ; 392~394.
 7. 許浚, 東醫寶鑑, 서울 : 南山堂, 1989 ; 512~516.
 8. 洪元植, 精校黃帝內經素問, 서울 : 東洋醫學研究院, 1985 ; 66.
 9. 洪元植, 精校黃帝內經靈樞, 서울 : 東洋醫學研究院, 1985 ; 178,249,309.
 10. 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-, 1995 ; 18~53.
 11. Mary Ann Sells, Mei-Ling Chen, George Acs, Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with colonized hepatitis B virus DNA, Proc, Natl, Acad, Sci, USA, 1987 ; Vol. 84 ; 1005~1009.
 12. Pascale Berthillong, Jean-Marc Crance, Francoise Leveque et al., Inhibition of the expression of hepatitis A and B viruses proteins by interferon in a human hepatocarcinoma cell line, the Journal of Hepatology, 1996 ; 25 ; 15~19.
 13. 金珍珠, 茵陳清肝湯의 MHV-2로 誘發된 마우스의 損傷肝에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1996.
 14. 李長勳, 肝疾患治療劑의 効能에 關한 實驗的 研究, 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 - 肝臟編-, 1995 ; 123~163.
 15. 남광우, 만성 간질환 환자의 간조직에서 B형 간염 바이러스 항원의 발현 및 DNA 검출에 관한 연구, 대한내과학회지, 1995 ; 48권 6호 ; 727~735.
 16. 禹弘楨, 李長勳, 金善珉, 茵陳清肝湯이 HepG 2.2.15 Cell의 HBeAg발현 억제에 미치는 效果, 경희한의대논문집, 1998 ; 21(1) ; 171~179.
 17. Peter R. Galle, Jens Hagelstein, Burkhard Kommerell, Martin Volkmann, Peter Schranz, Hanswalter Zentgraf, In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus, Gastroenterology, 1994 ; 106 ; 664~673.
 18. 金榮哲, 茵陳清肝湯의 安全性에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院, 1996.
 19. 朴容禎, 茵陳清肝湯加味方의 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1998.
 20. Rene Romero, Joel E. Lavine, Cytokine Inhibition of the hepatitis B virus core promoter, hepatology, 1996 ; 23(1) ; 17~23.
 21. Wolfgang H. Caselmann, Markus Meyer, Siegfried Scholz, Peter Hans Hofschneider, Rajen Koshy, Type I Interferons Inhibit Hepatitis B Virus Replication and Induce Hepatocellular Gene Expression in Cultured Liver Cells, JID, 1992 ; 166 ; 966~971.
 22. 조홍건, 수종 한약재가 바이러스성 간염에 미치는 영향에 대한 연구, 경희대학교 대학원, 1987.