

# Hep G2 세포에서 간염제1탕의 에탄올에 의한 세포독성 억제효과

나기웅, 박용권, 김강산, 강병기

원광대학교 한의과대학 간계내과학교실

## The Effect of *Hepatitis Treatment-Tang No.1* on Ethanol-Induced Cytotoxicity of Hep G2 Cells

Ki-Ung Ra, Young-Kweon Park, Gang-San Kim, Byung-Ki Kang

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

**Object :** *Hepatitis Treatment-tang No.1* has been used for the treatment of Liver disease and Jaundice. Long-term EtOH exposure leads to immunoregulatory and detoxification impairment. This study aimed to determine the relationship between TNF- $\alpha$  production and expression, and EtOH-induced cytotoxicity on Hep G2 cells.

**Method :** Cells were incubated with EtOH in the presence or absence of HT. The cells were tested after 24 hours and, again, after 48 hours. Cytoviability and TNF- $\alpha$  release were analyzed by MTT assay and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. After 24 hours of EtOH exposure, the cytoviability decreased, and the release of TNF- $\alpha$  was increased. Increased amounts of TNF- $\alpha$  contribute to EtOH-induced cytotoxicity. The Anti-TNF- $\alpha$  antibody almost abolished it. Interestingly, EtOH-induced cytotoxicity and TNF- $\alpha$  production were inhibited by HT. Moreover, when HT was used in combination with the anti-TNF- $\alpha$  antibody, there was a marked inhibition of EtOH-induced cytotoxicity.

**Results :** These results suggest that HT may prevent the cytotoxicity through partial inhibition of the TNF- $\alpha$  secretion.

**Key Word :** *Hepatitis Treatment-tang No.1*, Cytotoxicity, TNF- $\alpha$ , Hep G2 Cells.

## 1. 緒 論

알콜성 간질환과 관련된 질환을 한의학에서는 주상증이라하며 黃疸, 脹滿, 腹痛, 鼓脹, 勞倦傷 등의 증후 부분에 기재되어 있다. 원광대학교 부속한방병원에서는 이러한 알콜성 간질환 환자에게 간염제1탕을 응용하여 치료효과를 나타내고 있으며, 여기에 사용된 간염제1탕은 《금궤요략》의 '인진오령산'에서 백출과 계지를 제거하고 破瘀利氣藥인 삼릉과 봉출을 가하여 만들어진 처방이며, 肝膽濕熱로 인한 黃疸, 身目黃色鮮明, 發熱, 小便短赤 또는 發黃, 腹水 등의 병증에 사용하고 있다.

알콜성 간질환을 가지고 있는 환자들의 blood monocytes는 정상인과 비교해 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 와 IL-6의 생성량이 3~6배 정도가 높으며, 에탄올에 의해 유도되어지는 TNF- $\alpha$ , IL-6와 IL-1 $\alpha$ 의 생성, 발현과 간의 손상은 Hep G2 세포를 사용하여 이미 밝혀진 내용들이다<sup>1,5</sup>. 이와 같은 세포활성물질을 사람에게 주입시켰을 경우, 열을 발생시키며 염증과 조직파괴를 일으키며, 일부는 속과 죽음에까지 이르게 한다<sup>6</sup>. 그러나 이들은 항세포증식작용, 항미생물작용과 항종양작용이 있기 때문에 잘 이용하면 종양, 감염성질환, 면역계질환과 같은 질병의 치료에도 중요하게 쓰일 수 있다<sup>7</sup>. 특히

천문동과 원지는 각각 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 의 생성을 억제시켜 간세포 보호작용이 있다고 보고되었다<sup>8,9</sup>.

본실험과 관련된 실험적 연구로 金<sup>10</sup>이 인진오령산이 간경변에 대하여 간세포의 기능을 보호 내지는 회복시키는 작용이 있음을 보고하였고, 金<sup>8</sup>이 원지가 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 억제시켜 에탄올에 의한 독성으로부터 간세포를 보호하는 작용이 있음을 보고하였고, 金<sup>9</sup>은 천문동이 에탄올에 의해 증가되는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시킴으로써, 에탄올에 의한 간세포의 독성작용을 억제하여 간세포를 보호하는 작용이 있음을 보고하였다.

그러나 현재 복합처방에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 의 억제효과에 대한 실험결과는 보고된 바 없으나, 복합처방에 의한 결과 또한 억제효과가 있을 것으로 사료

접수: 2001년 5월 12일 채택: 2001년 6월 15일  
교신저자: 나기웅 (전북 군산시 경암동 609-6 나운도 한의원, 전화: 063-445-5851, E-mail: rayundo@kornet21.net)  
이 논문은 2000년도 원광대학교 교비지원에 의하여 수행되었음

되어 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 세포독성에 대한 간염제1탕의 억제효과를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 시약

에탄올은 Merck KGaA (germany)에서, 재조합 TNF- $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체는 R & D (USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)은 Gibco BRL에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma chemical co.에서, 세포배양용 plates, ELISA용 plates 및 dishes는 Nunc (Naperville, MD)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 세포배양 및 chemical처리

사람의 hepato-blastoma cell line인 Hep G2 세포는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  incubator에서 배양하였다. 96 well에  $2 \times 10^5$  cells/well을 plating하고 12시간 이상 안정화시킨 후 EtOH, 재조합 TNF- $\alpha$  (30 pg/ml), TNF- $\alpha$ 에 대한 항체 (30 pg/ml)와 간염제1탕을 농도별 (0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml)로 처리하였다. 간염제1탕과 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체 전처리는 30분 동안 실시하였으며 모든 chemical은 24시간 동안 처리하였다.

### 3. 간염제1탕의 구성약물 및 전탕액 제조

본 실험에 사용한 약제는 원광대학교 한의과대학 부속익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 간염제1

Prescription of Hepatitis Treatment-tang No.1

본초명	학명	중량(g)
인진저택	HERBA ARTEMISIAE CAPILLARIS	300
령사	POLYPORUS	300
백복령	RHIZOMA ALISMATIS	300
삼릉	PORIA	300
봉출	RHIZOMA SCIRPI SEU SPARGANII	300
	RHIZOMA ZEDOARIAE	300
총량	(용량은 실험상 사용용량임)	1800

탕 1첩의 내용과 분량은 위의 표와 같다. 간염제1탕 전탕액은 적량의 증류수를 약탕기에 넣고 약 3시간 다려서 조제하였다. 조제한 전탕액은 여과하여 동결 건조한 다음 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험시 사용하였다.

### 4. MTT assay

24시간 시약 처리 후, 각 sample의 배지를 제거하고 새로운 배지로 1회 씻어냈다. 96 well에 200 $\mu$ l의 배지를 넣고 stock 농도가 5 mg/ml인 MTT를 20 $\mu$ l씩 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 방치하였다. 살아있는 세포는 검푸른색의 formazan을 형성하며 죽은 세포는 formazan을 형성하지 않는다. formazan을 dimethyl sulfoxide에 녹인 후, 흡광도계 (540nm)로 측정하였다.

### 5. ELISA

세포활성물질의 정량은 ELISA 방법을 사용하며, 96 well ELISA plate에서 duplicate로 실행하였다. 세포활성물질에 대한 단클론 항체 1  $\mu$ g/ml을 phosphate buffered saline(이하 PBS, pH 7.4)로 희석하여 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 각각 입힌 다음 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 방치하였다. 이 plate를 0.05% Tween이 포함된 PBS로 씻어낸 다음 1% bovine serum albumin 5% sucrose, 0.05% NaN $_3$ 가 포함된 PBS

로 1시간 동안 blocking하였다. 여러차례 씻어낸 다음 sample을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 방치하였다. Plate wells를 다시 씻고 biotin이 결합된 항체 0.2  $\mu$ g/ml을 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 방치하였다. Well을 씻어낸 다음 avidine peroxidase를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 방치하였다. Well을 다시 씻은 다음에 ABTS 기질을 첨가하였다. 발색반응은 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였고 표준 곡선은 순차적으로 희석된 재조합 세포활성물질을 사용하여 각각의 정량에 적용하였다.

### 6. 통계학적 분석

모든 자료는 means  $\pm$  S. E.로 나타내었으며, 통계학적 분석은 student's t-test로 행하였다. 유의 수준은 P < 0.05로 하였다

## III. 實驗成績

### 1. 에탄올의 cytoviability에 대한 효과

본 연구에서는 먼저 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 cytoviability에 대해 조사하였다. 이미 보고된 바에 의하면<sup>11-13</sup>, Hep G2 세포에 에탄올을 장시간 처리하게 되면 cytoviability가 감소한다. Hep G2 세포에 에탄올 (4%)을 24

시간, 48 시간 동안 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, 에탄올을 24 시간 처리하였을 경우에 cytoviability가 대조군에 비해 약 35%, 48 시간 경우에는 약 50% 정도로 시간-의존적으로 감소하였다(Fig. 1).

### 2. 에탄올에 의한 세포독성에 있어 간염제1탕의 억제효과

본 연구에서는 간염제1탕이 에탄올에 의한 세포독성을 억제 할 수 있는지 MTT assay를 통하여 조사하였다. 간염제1탕을 농도별 (0.1, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$ )로 단독 처리한 경우에는 대조군과 유사한 cytotoxicity를 보였고 (Fig. 2A), 에탄올과 함께 24 시간 처리하였을 경우에는 1  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 에탄올에 의한 세포독성을 약 12%, 48 시간 경우에는 15% 정도 억제시켰다 (Fig. 2B).

### 3. 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ 생성에 대한 간염제1탕의 억제효과

Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 세포독성이 에탄올에 의해 TNF- $\alpha$  생성이 증가되어 나타나는 현상인지를 알아보기 위해, 본 연구에서는 에탄올을 처리하여 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 ELISA 실험을 통하여 조사하였다. 그 결과, 에탄올 처리에 의해 Hep G2 세포에서 TNF- $\alpha$ 가 대조군에 비해 약 3배 정도가 증가하였다(Table 1). 또한 Hep G2 세포의 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ 의 합성 증가에 있어 간염제1탕이 억제효과를 보이는지에 대한 실험을 시행하였다. 먼저 간염제1탕을 농도별 (0.1, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$ )로 각각 단독 처리하여 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 ELISA로 측정된 결과, 대조군과 거의 비슷한 양상을 보였으며 에탄올에 의해서는 TNF- $\alpha$ 의 현저한 합성 증가를 보였다. 흥미롭게도 에탄올과 함께 간염제

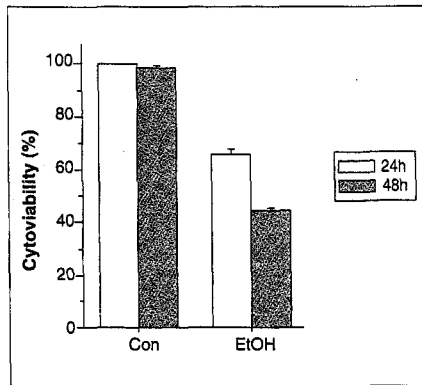


Fig. 1. Effect of EtOH on cytoviability in Hep G2 cells. The cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with DMEM (control) and 4% EtOH for 24 h and 48 h. The cytoviability was measured in three different plates in triplicate using MTT assay. ( $P < 0.05$  versus control)

1탕을 농도별로 처리하였을 경우, TNF- $\alpha$ 의 생성량을 대조군 수준과 유사한 수준까지 감소시켰다. 이러한 결과는 간염제1탕이 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시킨다는 것을 보여준다.

### 4. 에탄올에 의한 세포독성에 있어 TNF- $\alpha$ 의 효과

본 연구에서는 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 세포독성이 TNF- $\alpha$ 에 대한

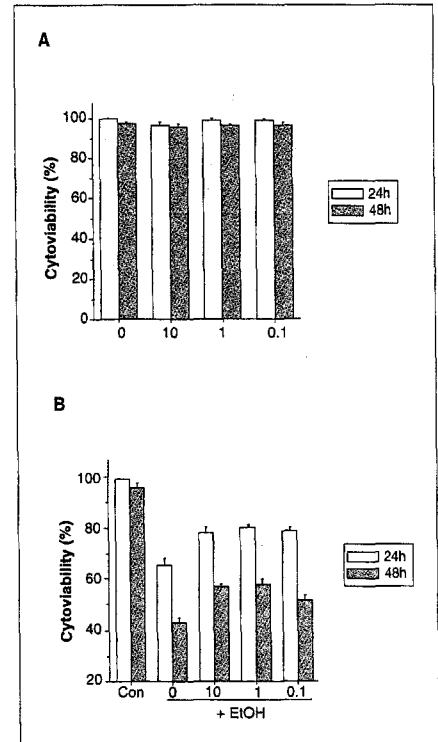
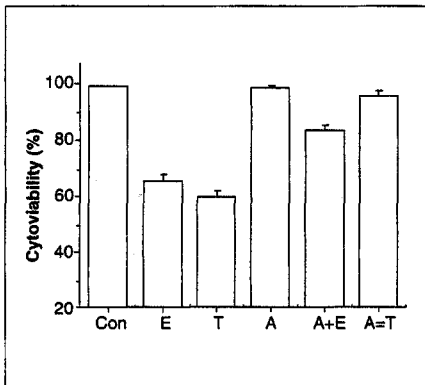


Fig. 2. Effect of HT on EtOH-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. The cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were incubated for in medium (control) containing EtOH with various concentrations (0.1, 1, and 10  $\mu\text{g/ml}$ ) of HT. Panel A (HT alone), panel B (4% EtOH plus HT). The cytoviability was measured in three different plates in triplicate using MTT assay. Each data value indicates the mean  $\pm$  S.E.M. of five separated experiments. There are significant difference between groups. ( $P < 0.05$  versus control)

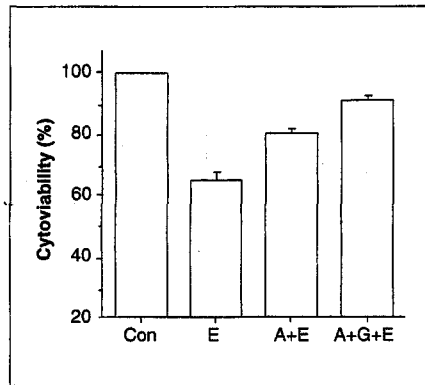
Table 1. Effect of HT on TNF- $\alpha$  secretion by Hep G2 cells<sup>a</sup>

Treatment		TNF- $\alpha$ secretion (pg/ml)
EtOH (4%)	HT ( $\mu\text{g/ml}$ )	
-	-	37 $\pm$ 0.4
-	10	44 $\pm$ 0.8
-	1	45 $\pm$ 0.3
-	0.1	27 $\pm$ 1.0
+	-	119 $\pm$ 1.4
+	10	52 $\pm$ 0.6*
+	1	37 $\pm$ 0.5*
+	0.1	44 $\pm$ 0.9*

<sup>a</sup>The cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h in medium alone or in medium containing EtOH (4%) with various concentrations of HT. The supernatants were collected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed for TNF- $\alpha$  concentration. Each data value indicates the mean  $\pm$  S. E. of three separated experiments. ( $P < 0.05$  versus EtOH-treated control.)



**Fig. 3.** Effect of HT on TNF- $\alpha$  induced cytotoxicity in Hep G2 cells. The cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were incubated for in medium (Con) containing 4% EtOH (E) and 30 pg/ml recombinant TNF- $\alpha$  (T) and 30 pg/ml anti-TNF- $\alpha$  antibody. The cytoviability was measured in three different plates in triplicate using MTT assay. Each data value indicates the mean  $\pm$  S.E.M. of five separated experiments. There are significant difference between groups. (  $P < 0.05$  versus control )



**Fig. 4.** Synergistic inhibitory effect of HT and anti-TNF- $\alpha$  antibody on EtOH-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. The cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were incubated for in medium (Con) containing 4% EtOH (E) and 30 pg/ml anti-TNF- $\alpha$  antibody (Ab). The cytoviability was measured in three different plates in triplicate using MTT assay. Each data value indicates the mean  $\pm$  S.E.M. of five separated experiments. There are significant difference between groups. (  $P < 0.05$  versus control )

항체를 처리하였을 경우 억제가 되는지를 조사하였다. 에탄올과 함께 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체 (30 pg/ml)를 처리하고 또한 재조합 TNF- $\alpha$  (30 pg/ml)를 배양세포에 직접 처리하였다. 그 결과, 재조합 TNF- $\alpha$ 를 단독 처리하였을 경우에 세포독성이 에탄올 단독 처리한 경우보다 더 많이 증가되었고, TNF- $\alpha$ 에 대한 항체를 같이 처리하였을 경우에는 이러한 현상이 완전히 억제되었다 (Fig. 3). 또한 에탄올과 함께 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체를 처리하였을 경우에는, 세포독성이 완전히 억제되지 않은 것으로 보아 에탄올에 의한 세포독성은 전적으로 TNF- $\alpha$ 가 담당하고 있지 않다는 것을 보여준다. 또한 에탄올을 처리하였을 경우에 Hep G2 세포의 세포독성이 증가하는데, 간염제1탕을 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체와 같이 처리하였을 경우에는 에탄올에 의한 세포독성이 훨씬 더 억제가 되었다

(Fig. 4). 이러한 결과는 에탄올에 의한 세포독성에는 TNF- $\alpha$  외에 다른 인자가 관여할 가능성이 크며 간염제1탕은 에탄올에 의한 또다른 인자를 억제하는 것으로 보였다.

#### IV. 考 察

한의학적으로 알코올성 간질환에 대해 장중경은 《금궤요략》에서 과음으로 인한 황달을 酒疸이라 하고 眼球黃染, 小便黃赤, 痞滿感, 食欲부진 혹은 구토 등의 증상을 기술하였으며, 소원방은 《제병원후론》<sup>14</sup>에서 “비위에 열이 있으면 穀氣가 鬱蒸하여 이로 인해 熱毒이 증가하고 따라서 갑자기 發黃하게 되며..., 황달은 술과 음식이 과다하여 생기는 것이니 장부가 불화하고 수곡이 서로 어울려 이루어지는 것”이라 하여 熱毒 외에 식음부절이 肝病의 원인임을 지적

함과 동시에 酒傷을 세분하고 장기의 허실에 따른 변화를 관찰하였다. 그 후에도 酒傷病에 관한 연구가 계속되어 왔으며, 이들 중 대부분이 알코올성 간질환과 관련이 있다.

알코올성 간질환은 알코올성 지방간, 알코올성 간염, 알코올성 간경변 등의 과정을 경과하며 간질환을 일으키게 되며, 알코올성 지방간, 급성간염, 만성활동성간염 등에서 증가하는 과산화지질은 지질과 단백질로 구성된 세포막에 free radical이 작용하여 불포화지방산을 과산화시켜 생긴 것으로 세포막의 투과성을 변화시키고 이로 인해 세포막의 파괴를 초래하여 세포독성을 유발시키는 것으로 알려져 있다<sup>20</sup>.

흡수된 알코올의 2% (저혈중 알콜농도)에서 10% (고혈중 알콜농도)는 직접 폐, 소변 혹은 땀을 통해 배설되나 대부분은 간에서 아세트알데히드로 대사된다. 肝에서 3가지의 주요 경로를 통해 대사가 이루어지는데 각기 다른 에탄올 적정농도 (Km)를 가지며, 결과적으로 시간당 한 잔의 알코올이 대사된다. 첫째, 임상적으로 중요한 경로는 세포질에서 20 mM의 Km값에서 알코올 탈수소효소 (ADH)에 의해 일어난다. 이 반응으로 아세트알데히드가 생기고, 이것은 세포질이나 미토콘드리아에서 알데히드 탈수소효소 (ALDH)에 의해 급속히 파괴된다. 이 각 단계는 조효소로 니코틴아미드 아데노신 디뉴클레오티드 (NAD)를 필요로 하며, 음주 후에 보이는 대사 혼란상태는 조효소 NAD가 NADH로 되기 때문이다. 둘째, Km 값이 10 mM인 활면소포체의 마이크로솜이 고혈중농도에서 10%나 그 이상으로 에탄올 산화에 책임이 있다. 이 체계의 활성도는 반복적으로 에탄올에 노출된 후 증가한다<sup>15</sup>. 셋째, peroxisome과

미토콘드리아에 존재하는 catalase 등이다.

알코올과 관련된 실험으로朴<sup>16</sup>이 加減葛花解醒湯이 Ethanol 중독 흰쥐의 간기능 회복작용이 있음을 보고하였고, 金<sup>17</sup>은 갈근 추출물이 에탄올을 투여한 흰쥐의 지질과산화물을 감소시킴을 보고하였고, 金<sup>18</sup>은 인진오령산이 간경변에 대하여 간세포 기능을 보호 내지는 회복시키는 작용이 있음을 보고하여 한약과 간기능 사이의 연관작용에 대하여 연구가 이루어졌다.

세포활성물질은 세포조절기능을 가진 단백질군을 통칭하는 것으로 면역과 염증반응의 강도와 기간을 조절하는 물질이다. 이들은 세균감염이나 염증시 방어에 관여할 뿐만 아니라 조직 파괴에도 작용함으로써 여러 질병의 병인과 관련되며, 이들을 조절하는 약물이 치료제로서의 가능성도 또한 가지고 있다. 이러한 치료제로서의 가능성을 확인한 연구로 金<sup>19</sup>과 金<sup>20</sup>은 각각 원지와 천문동이 에탄올에 의해 증가되는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 억제시킨다는 연구결과를 보고하였다.

TNF- $\alpha$ 를 비롯한 대부분의 세포활성물질들은 표적세포의 세포표면 수용기를 통하여 작용하며 작용기전은 호르몬과 유사하다. TNF- $\alpha$ 는 煎炎症性 세포활성물질로 잘 알려져 있으며 세포내활성산소를 유도하는 기능이 있으며 18,19, TNF- $\alpha$ 는 대식세포가 분비하는 인자로 처음 밝혀져 현재까지 약 20여년간 연구가 진행되고 있으며 T lymphocytes와 NK 세포도 역시 TNF- $\alpha$ 를 생성하는 것으로 알려졌다<sup>21</sup>. TNF- $\alpha$ 는 생성된 level에 따라 세포나 조직에 미치는 영향이 전혀 다른 양면성을 지니고 있다. 그 예를 간에서 보면, 낮은 level의 TNF- $\alpha$ 는 acute phase response

를 활성화시키고 hepatocyte의 증식을 유도하며, 망간 초산화물 불균등화 효소 생성을 촉진 등의 방어기작에 기여한다. 반대로 높은 level의 TNF- $\alpha$ 는 hepatotoxic response와 fibrogenesis에 관여한다<sup>22,23</sup>.

사람의 간암 세포주인 Hep G2 세포는 알코올에 의한 간의 손상을 연구하는데 아주 적합한 모델이며, 세포손상은 알코올의 처리시간과 농도에 의존적이다<sup>11-13</sup>. Hep G2 세포에 에탄올을 장시간 처리하면, 생화학적·형태학적 특성이 알코올에 의한 간질환 환자에서 보여지는 특성과 유사하게 나타난다. 몇몇 연구자들은 이 세포주가 drug metabolic function을 가지고 있다고 보고하였다. 에탄올은 시간과 농도에 의존적으로 cytoviability를 감소시키며, 에탄올을 장시간 처리하게되면 세포의 면역조절력과 해독력을 저해한다<sup>24</sup>.

간염제1탕은 원광대학교 부속한방병원에서 肝膽濕熱로 인한 黃疸, 身目黃色鮮明, 發熱, 小便短赤, 또는 發黃, 腹水 등의 병증에 응용하고 있는 처방이며 구성약물은 인진 저령 택사 백복령 삼릉 봉출 각 300g으로 각 약물에 대한 효능효과를 살펴보면 아래와 같다.

인진은 淸利濕熱·退黃 등의 효능이 있어 黃疸, 發黃, 小便難 등의 병증을 치료하며, 저령은 滲濕·利水 등의 효능이 있어 小便不利, 水腫, 泄瀉, 淋濁, 帶下 등의 병증을 치료하며, 택사는 甘淡으로 利水滲濕하고 性이 寒하여 腎經의 火를 泄할 수 있으며, 방광의 熱을 瀉하기 때문에 흔히 利水·祛濕·泄熱의 要藥이다. 백복령은 利水滲濕·健脾補中·寧心安神 등의 효능이 있어 小便不利, 水腫, 痰飲, 脾氣虛弱, 心悸, 失眠 등의 병증을 치료하며, 삼릉은 破氣祛瘀작용이 강하므로 瘀滯氣結이나 瘀血結塊

등으로 인한 血滯經閉, 또는 產後瘀血腹痛, 癥瘕積聚 등의 병증에 응용하며, 봉출은 行氣破血·消積止痛 등의 효능이 있어 脘腹脹滿疼痛, 經閉腹痛, 癥瘕積聚 등의 병증을 치료한다<sup>25,26</sup>.

본 연구에서는 간염제1탕이 아주 효과적으로 에탄올에 의한 세포손상으로부터 방어한다는 것을 밝혔다. 그러나 어떤 기작에 의해 작용하는 것인지는 아직 자세히 이해되지 않았다. Fig. 1에서 보였듯이, 에탄올은 Hep G2 세포에서 시간-의존적으로 아주 강한 세포독성을 보이며 Table 1.에서와 같이 TNF- $\alpha$ 의 분비량도 현저히 증가시킴을 알 수 있다. 이러한 사실은 에탄올이 세포에 작용하여 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유발했다는 것을 제시해준다. 세포손상을 일으키는데 있어 TNF- $\alpha$ 의 역할을 규명하기 위하여 재조합 TNF- $\alpha$ 를 직접 처리한 결과 에탄올보다 조금 더 높은 세포독성을 보였다. 또한 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체를 같이 처리하였을 경우 세포독성이 감소한다는 결과는 에탄올에 의한 세포독성을 설명하는데 있어 TNF- $\alpha$ 가 강력한 candidate가 될 수 있다는 것을 제시해준다. TNF- $\alpha$ 의 낮은 level은 세포증식을 위해 요구되며<sup>27</sup>, 높은 level은 세포로 하여금 손상을 가져온다<sup>28,30</sup>. 에탄올과 함께 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체를 같이 처리하였을 경우에 세포독성이 완전히 억제되지 않은 것은, 에탄올에 의한 세포손상에 있어 TNF- $\alpha$ 가 전적으로 관여하는 것이 아니라 부분적으로 관여한다는 것을 보여준다. 이러한 사실은 에탄올의 metabolic alterations도 고려하지 않을 수 없다.

이상의 결과로 보아, 에탄올에 의한 세포독성에는 아주 복잡한 과정이 관여하고, 여기에 TNF- $\alpha$ 가 부분적으로 기여하며, 간염제1탕은 TNF- $\alpha$ 의 생성을

억제시켜 에탄올에 의한 독성으로부터 간세포를 보호하는 것으로 보인다. 따라서 간염제1탕은 알콜에 의한 간손상의 예방에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

본 연구에서는 간염제1탕이 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$  분비에 대한 억제작용을 함으로서 세포독성을 감소시킬 수 있을 것인지를 알아보기 위하여 본 연구를 수행하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

에탄올은 Hep G2 세포에서 시간-의존적으로 cytoviability를 유의성있게 감소시키고 TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시킨다. 에탄올로 인한 Hep G2 세포의 세포독성은 TNF- $\alpha$ 에 대한 항체 처리에 의해 부분적으로 억제되었다. 간염제1탕은 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$  합성증가를 유의성있게 억제시키고 에탄올에 의한 세포독성을 유의성있게 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때 간염제1탕은 에탄올에 의해 증가되는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시킴으로서, 에탄올에 의한 간세포의 독성작용을 억제하여 간세포를 보호하는 것으로 사료된다. 그러나 에탄올에 의한 세포독성이 오직 TNF- $\alpha$ 에 의해서만 이루어지는 것이 아니고 다른 복잡한 과정들이 관여한다고 생각되며, 또한 간염제1탕이 어떤 기전으로 TNF- $\alpha$ 에 대한 생성을 억제하는 지에 대한 연구도 또한 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## VI. 參考文獻

- 이중수. 간다스리는 법. 서울: 동아일보사; 1988, pp.162~173
- 김병운 외. 간계내과학. 서울: 집문당; 1992, pp.230~231, 248, 254~256
- 張仲景. 仲景全書. 중화민국: 集文書局; 1972, pp. 394-395
- McClain, C. J., and Cohen, D. A. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1989; 9: pp.349-351
- Deviere, J., Content, J., Denys, C., Vandenbussehe, P., Schandene, L., Wybran, L., and Dupont, E. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 1990; 11: pp. 628-634
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 2000; pp.503-508
- Elmslie RE, Dow SW, Ogilvie GK. Interleukins. biological properties and therapeutic potential. *J. Vet. Intern. Med.* 5, 1991. pp.283-93
- 김종철. Hep G2 세포에서 에탄올 세포독성의 IL-1 $\alpha$  분비에 있어 원지의 억제효과, 원광대학교 대학원; 1999
- 전영세. Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 세포독성증 TNF- $\alpha$  생성에 대한 천문동의 억제효과, 원광대학교 대학원; 1999
- 김우환. 인진오경산이 백서 간경변에 대한 보호 및 회복작용, 원광대학교 대학원; 1988
- Akerman, P, Cote P, Yang SQ, Mc Clain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor alpha inhibit induction of hepatocyte and non-parenchymal cell proliferation after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: G579-G585
- Ostenson ME, Thiele DL, Lipsky PE. Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1987; 138: pp.4185-4191
- Coletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Streter LM, Campbell DA. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after ischemia / reperfusion injury in the rat. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: pp.1936-1943
- 巢元方. 巢氏諸病源候論. 北京: 人民衛生出版社; 1983, pp. 395~397, 598, 619~620, 750~753, 768~769
- Kurt J. Isselbacher. HARRISON S 내과학2권 (한글제1판), 서울: 정담; 1997, p 2613
- 朴定守. 加減葛花解醒湯이 Ethanol 中毒 환자의 肝機能에 미치는 影響, 大邱韓醫科大學; 1987
- 김은실. 갈근 추출물이 에탄올을 투여한 환자의 지질과산화에 미치는 영향, 동아대대학원; 1998
- Goossens V, De Vos K, Vercammen D, Steemans M, Vancompernelle K, Fiers W, Vandenebeele P, Grooten J. Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors* 10, 1999; 10: pp.145-156
- 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. USA* 1995; 92; pp.8115-8119
- Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm. Acta. Helv.* 74, 2000; pp.281-286
- Smyth MJ, Johnstone RW. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc. Res. Tech.* 2000; 50; pp.196-208
- Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Flood L, Wang S, Hubbs A, Luster MI. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998; 151; pp.359-366
- Kuncio GS, Tsyganskaya M, Zhu J, Liu SL, Nagy L, Thomazy, Davies PJ, Zern MA. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am. J. Physiol.* 1998; 274; G240-245
- Marselos, M., Strom, S. C., and Michalopolus, G. Effect of phenobarbital and 3 methyl-chloranthrene on aldehyde dehydrogenase activity in cultures of Hep G2 cells and normal human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 1987; 62; pp.75-88
- 김창민 외 역. 국역 중약대사전. 서울: 도서출판 정담; 1998, pp.2374~2379, 2742~2746, 4509~4516, 4768~4772, 5671~5677, 5904~5908

26. 申佶求. 申氏本草學 各論, 壽文社; 1988, pp.357~362, 364~371, 548~551, 661~663
27. Akerman, P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM. Antibodies to tumor necrosis factor alpha inhibit induction of hepatocyte and non-parenchymal cell proliferation after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 1992; 263; G579-G585
28. Ostenson ME, Thiele DL, Lipsky PE. Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1987; 138; pp.4185-4191
29. Coletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Streter LM, Campbell DA. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after ischemia/reperfusion injury in the rat. *J. Clin. Invest.* 1990; 85; pp.1936-1943
30. Naume B, Shalaby R, Lesslauer W, Espevik T. Involvement of the 55- and 75-kDa tumor necrosis factor receptors in the generation of lymphokine-activated killer cell activity and proliferation of natural killer cells. *J. Immunol.* 1991; 146; pp.3045-3048