

# 인진호가 Hep G2 세포에서 에탄올 매개성 Cytokine 분비에 미치는 영향

최수덕, 심정섭, 김일환, 김강산, 강병기

원광대학교 한의과대학 간계내과학교실

## The Effect of *Artemisia Capillaris Herba* on Ethanol-Induced Cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) Secretion in Hep G2 Cells

Su-Deock Choi, Jung-Sub Sim, Il-Hwan Kim, Gang-San Kim, Byung-Ki Kang

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

A human hepatoma cell line, Hep G2 cells, is reliable for the study of alcohol-induced hepatotoxicity. The aim of this study is to determine the relationship between TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  production and EtOH-induced cytotoxicity on Hep G2 cells. The cells were incubated with EtOH in the presence of *Artemisia Capillaris Herba*(AC) for 24 hours and in the absence of AC for 48 hours. Cytoviability and cytokines release were analyzed by MTT assay and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. After 24 hours of EtOH exposure, the cytoviability had markedly decreased, and the release of cytokines had increased. The increased amount of cytokines contributed to EtOH-induced cytotoxicity. Anti-TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  antibodies almost abolished it. Interestingly, EtOH-induced cytotoxicity and cytokines production were inhibited by AC. Moreover, when AC was used in combination with antibodies, there was a marked inhibition of EtOH-induced cytotoxicity. These results suggest that EtOH-induced cytotoxicity may regulate, by various factors, and AC may prevent the cytotoxicity through partial inhibition of the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  secretion.

**Key Word :** *Artemisia Capillaris Herba*(AC), Hep G2 cells, hepatotoxicity TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ .

### I. 緒 論

알코올성 간질환은 한의학적으로 酒傷症의 범주에 속할 뿐 아니라 黃疸, 積聚, 脹滿, 勞倦傷 등과도 밀접한 관련이 있으며, 酒의 성질을 大熱有毒한 것으로 보고 있으므로 酒傷症의 주요 치법은 清熱利濕을 기본으로 하고 있다<sup>1</sup>. 인진호는 국화과에 속한 다년생 초본으로 사철썩이라고도 하며 滲濕利水, 清濕熱作用이 있어 黃疸 등 濕熱薰蒸型 간질환에 응용되고 있다<sup>2</sup>.

IL-1 $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$ 는 간의 Kupffer 세포에서 많은 양이 생성되며 급성기 단백질의 생산을 포함한 단백질, 탄수화물, 지방대사에도 관여함이 알려져 있다. 알코올성 간질환을 가지고 있는 환자들의 blood monocytes는 정상인과 비교해 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 와 IL-6의 생성량이 3~6배 정도가 높다<sup>3,4</sup>. IL-6 level과 치사율 사이의 연관성에 대하여 IL-6 level은 임상적 회복과 함께 다시 정상화된다고 보고된 바 있다<sup>5,6</sup>. 그러나 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 증가는 서로 관련성이 없으나

TNF- $\alpha$ 가 증가하면 IL-1 $\alpha$ 의 분비도 증가하며, hepatic acute phase 반응을 조절하는 IL-1 $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$  활성의 관여에 대한 연구가 많이 행해지고 있다<sup>7,8</sup>.

알코올성 간질환에 대한 연구로는 沈<sup>9</sup>의 脂肪肝方이 Ethanol로 유도된 脂肪肝 및 간재생능에 미치는 영향, 權<sup>10</sup>의 알콜 투여에 의한 쥐 뇌 및 간의 주요 대사에 미치는 인삼 추출물의 효과 등이 있지만, 인진호와 Hep G2 세포주를 이용하여 알코올에 의한 간손상을 연구한 결과를 접해 보지 못하였다. 沈<sup>11</sup>은 천문동이 Hep G2 세포에서 에탄올에 의해 증가되는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시킴으로 간세포를 보호하는 작용이 있음

접수: 2001년 5월 12일 채택: 2001년 6월 12일  
교신저자: 최수덕 (광주시 동구 산수2동 537-43 보인한의원, 전화: 062-266-8778, E-mail: boinee2@hanmail.net)  
이 논문은 2000년도 원광대학교 교비지원에 의하여 수행되었음

을 보고하였다.

이에 저자는 인진호가 사람의 간암세포주인 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 의 생성억제 효과를 관찰하여 유의성있는 결과가 있었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 시약

에탄올은 Merck KGaA (germany)에서, 재조합 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 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)와 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid)(ABTS) tablets는 Sigma chemical co.에서, ELISA용 plates는 Falcon (Oxnard, CA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양용 plates와 dishes는 Nunc (Naperville, MD)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 세포배양 및 chemical 처리

사람의 hepato-blastoma cell line인 Hep G2 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  incubator에서 배양하였다. 96 well에  $2 \times 10^5$  cells/well 을 plating하고 12 시간 이상 안정화시킨 후, EtOH (2%, 4%), 재조합 TNF- $\alpha$  (30 pg/ml), TNF- $\alpha$ 에 대한 항체 (30 pg/ml), 재조합 IL-1 $\alpha$  (30 pg/ml), IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체 (30 pg/ml)와 인진호를 농도별 (0.5, 1, 5  $\mu$ g/ml)로 처리하였다. 인진호 전처리는 30 분 동안 실시하였으

며 모든 chemical은 24 시간동안 처리하였다.

### 3. 인진호 전탕액 제조

실험에 사용한 인진호는 실험이 행해진 익산지역에서 구입되었고 인진호 전탕액은 적량의 증류수를 약탕기에 넣고 약 3시간 달여서 조제하였다. 조제한 전탕액은 여과하여 동결 건조한 다음 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험시 사용하였다.

### 4. MTT assay

24 시간 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 3 시간 동안 방치하였다. 살아있는 세포는 검푸른색의 formazan을 형성하며 죽은 세포는 formazan을 형성하지 않는다. Formazan을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후, 흡광도계 (540 nm)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(pH 7.4)로 희석하여 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 각각 입힌 다음 4 $^{\circ}$ C에서 12 시간 동안 방치하였다. 이 plate를 0.05% Tween이 포함된 PBS로 씻어낸 다음 1% bovine serum albumin, 5% sucrose, 0.05% NaN $_3$ 가 포함된 PBS로 1 시간 동안 blocking하였다. 여러 차례 씻어낸 다음 sample을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 방치하였다. Plate wells를 다시 씻고 biotin이 결합된 항체 0.2  $\mu$ g/ml을 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동

안 방치하였다. Well을 씻어낸 다음 avidine peroxidase를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 20 분 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. 에탄올이 TNF- $\alpha$ 분비에 미치는 영향

에탄올에 의한 Hep G2 세포의 세포독성이 TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시킴으로써 나타나는 현상인지를 알아보기 위하여, 본 연구에서는 에탄올을 농도별 (2, 4%)로 처리하여 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 ELISA 실험을 통하여 조사하였다. 그 결과, 에탄올의 농도가 2%의 경우 TNF- $\alpha$ 가 대조군에 비해 약 2.5배, 4%의 경우 4배 정도가 증가하였다 (Table 1). 이러한 결과는 에탄올이 Hep G2 세포에서 농도-의존적으로 TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시킨다는 것을 보여준다

### 2. 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ 생성에 대한 인진호의 억제효과

본 연구에서는 에탄올에 의한 Hep G2 세포의 TNF- $\alpha$  합성 증가에 있어 인진호가 억제효과를 보이는지에 대한 실험을 시행하였다. 먼저 인진호를 농도별 (0.5, 1, 5  $\mu$ g/ml)로 각각 단독 처리하여

TNF- $\alpha$ 의 생성량을 ELISA로 측정된 결과 모든 인진호 처리군에서 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제했지만(Table 2), 특히 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성있게 TNF- $\alpha$  생성량을 감소시켰다. 이러한 결과는 인진호가 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시킨다는 것을 보여준다.

### 3. 에탄올에 의한 세포독성에 있어 인진호의 억제효과

본 연구에서는 인진호가 에탄올에 의한 세포독성을 억제할 수 있는지 MTT assay를 통해 조사하였다. 인진호를 농도별 (0.5, 1, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 단독 처리한 경우에는 대조군과 유사하게 세포독성이 거의 없었으며 (Fig. 2A), 에탄올과 함께 24 시간 처리하였을 경우에는 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 에탄올에 의한 세포독성을 약 20% 정도 억제시켰다 (Fig. 2B).

### 4. 에탄올에 의한 IL-1 $\alpha$ 의 생성

에탄올에 의한 Hep G2 세포독성이 TNF- $\alpha$ 외에 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 증가시킴으로서 나타나는 현상인지를 규명하기 위하여, 본 연구에서는 에탄올을 농도별 (2, 4%)로 처리하여 IL-1 $\alpha$ 의 분비량을 ELISA 실험을 통하여 조사하였다. 그 결과 에탄올의 농도가 2%인 경우 IL-1 $\alpha$ 가 대조군에 비해 약 2배, 4%의 경우 2.5배 정도가 증가하였다 (Table 3). 이러한 결과는 에탄올이 Hep G2 세포에서 농도-의존적으로 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 증가시킨다는 것을 보여준다.

### 5. 에탄올에 의한 IL-1 $\alpha$ 생성에 대한 인진호의 억제효과

본 연구에서는 에탄올에 의한 Hep G2 세포의 IL- $\alpha$ 의 합성 증가에 있어 인진호가 억제효과를 보이는지에 대한 실험을 시행하였다. 먼저 인진호를 농도별

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

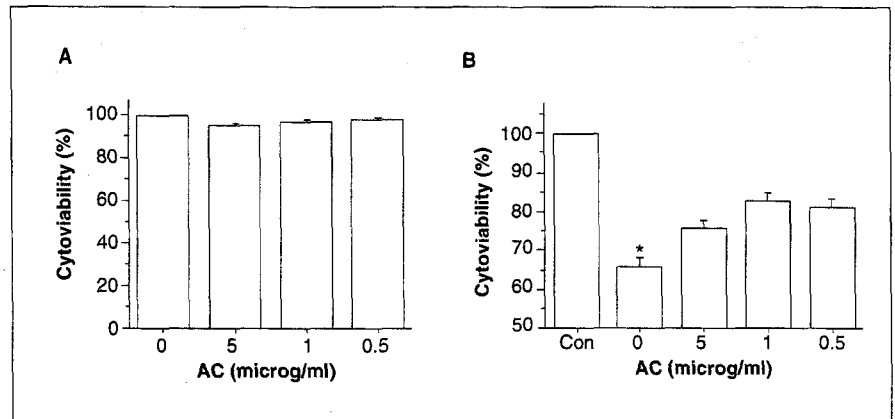
Treatment (EtOH)	TNF- $\alpha$ secretion (pg/ml)
0	29 $\pm$ 0.5
2%	83 $\pm$ 0.1*
4%	117 $\pm$ 0.9*

<sup>a</sup>The cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h in medium alone or in medium containing EtOH (2% and 4%). 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 control)

**Table 2.** Effect of AC on TNF- $\alpha$  secretion by Hep G2 cells<sup>a</sup>

Treatment		TNF- $\alpha$ secretion (pg/ml)
EtOH (4%)	AC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
-	-	29 $\pm$ 0.5
-	5	31 $\pm$ 0.3
-	1	27 $\pm$ 0.9
-	0.5	30 $\pm$ 0.6
+	-	117 $\pm$ 0.9
+	5	73 $\pm$ 0.4
+	1	52 $\pm$ 0.1*
+	0.5	61 $\pm$ 0.2

<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 AC. 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. 1.** Effect of AC 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 (5, 1, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of AC. Panel A (AC alone), panel B (4% EtOH plus AC). 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 3.** Effect of ethanol on IL-1 $\alpha$  secretion by Hep G2 cells<sup>a</sup>

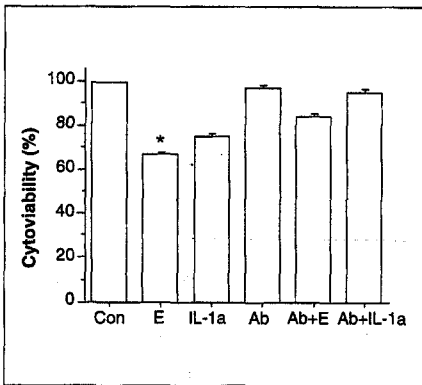
Treatment (EtOH)	IL-1 $\alpha$ secretion (pg/ml)
0	21 $\pm$ 0.1
2%	43 $\pm$ 0.3*
4%	54 $\pm$ 0.2*

<sup>a</sup>The cells ( $2 \times 10^5$  cells/well) were incubated for 24 h in medium alone or in medium containing EtOH (2% and 4%). The supernatants were collected and frozen at -80 $^{\circ}\text{C}$  until assayed for IL-1 $\alpha$  concentration. Each data value indicates the mean  $\pm$  S. E. of three separated experiments. ( $P < 0.05$  versus control)

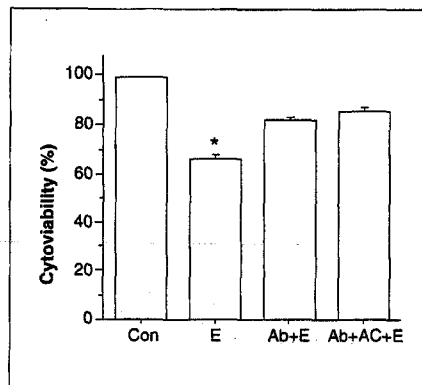
**Table 4.** Effect of AC on IL-1 $\alpha$  secretion by Hep G2 cells<sup>a</sup>

Treatment		IL-1 $\alpha$ secretion (pg/ml)
EtOH (4%)	AC ( $\mu$ g/ml)	
-	-	21 $\pm$ 0.1
-	5	28 $\pm$ 0.6
-	1	20 $\pm$ 0.7
-	0.5	19 $\pm$ 0.2
+	-	54 $\pm$ 0.2
+	5	39 $\pm$ 0.1
+	1	26 $\pm$ 0.2*
+	0.5	37 $\pm$ 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 AC. The supernatants were collected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until assayed for IL-1 $\alpha$  concentration. Each data value indicates the mean  $\pm$  S. E. of three separated experiments. ( $P < 0.05$  versus EtOH-treated control)



**Fig. 2.** Effect of AC on IL-1 $\alpha$  induced cytotoxicity in Hep G2 cells. The cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were incubated for in medium (control) containing 4% EtOH (E) and recombinant IL-1 $\alpha$  (30 pg/ml) and anti-IL-1 $\alpha$  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)



**Fig. 3.** Synergistic inhibitory effect of AC and anti-IL-1 $\alpha$  Ab 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-IL-1 $\alpha$  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)

(0.5, 1, 5  $\mu$ g/ml)로 각각 단독 처리하여 IL-1 $\alpha$ 의 생성량을 ELISA로 측정된 결과, 대조군과 거의 비슷한 양상을 보였다 (Table 4). 에탄올과 함께 인진호를 처리하였을 경우에는 IL-1 $\alpha$ 의 생성량을 현저히 감소시켰다. 이러한 결과는 인진호가 에탄올에 의한 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 억

제시킨다는 것을 보여준다.

### 6. 에탄올에 의한 세포독성에 있어 IL-1 $\alpha$ 와 인진호의 효과

본 연구에서는 에탄올에 의한 Hep G2 세포독성이 IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체를 처리하였을 경우 억제가 되는지를 조사

하였다. 에탄올과 함께 IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체 (30 pg/ml)를 처리하고 또한 재조합 IL-1 $\alpha$  (30 pg/ml)를 배양세포에 직접 처리하였다. 그 결과, 재조합 IL-1 $\alpha$ 를 단독 처리하였을 경우에 세포독성이 에탄올 단독처리한 경우보다 더 많이 증가하였고, IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체를 같이 처리하였을 경우에는 이러한 현상이 완전히 억제되었다 (Fig. 2). 또한 에탄올과 함께 IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체를 처리하였을 경우에는 세포독성이 완전히 억제되지 않은 것으로 보아 에탄올에 의한 세포독성은 TNF- $\alpha$ 외에 IL-1 $\alpha$ 가 부분적으로 관여한다는 것을 보여준다. 또한 에탄올을 처리하였을 경우에 Hep G2 세포의 세포독성이 증가하는데, 인진호를 IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체와 같이 처리하였을 경우에는 에탄올에 의한 세포독성이 더욱 억제되었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 에탄올에 의한 세포독성에는 IL-1 $\alpha$  외에 다른 인자가 관여할 가능성이 크며 인진호는 에탄올에 의한 또다른 인자를 억제하는 것으로 보였다.

## IV. 考 察

알코올성 간질환의 임상병리학적 표현은 알코올성 지방간, 알코올성 간염, 알코올성 간경화 등이며, 소량의 지방변화는 일과성으로 임상증상이 별로 나타나지 않으나, 지속성 또는 고도의 지방침윤이 있을 경우에는 임상증상이 나타나고, 심하면 간경변증이나 그 이상 악화된 간질환을 일으킨다<sup>11)</sup>. 국내에서 간질환 중 가장 높은 사망률의 원인은 바이러스성 간염이지만 미국과 같은 선진국에서는 바이러스성 간염보다 알코올성 간경화에 의한 사망률이 5-10배 정도로 높게 보고되고 있고, 바이러스성 간염은 최근들어 백신 사용으로 현저히

감소하고 있으나 알코올성 간경화에 의한 사망은 큰 위협으로 대두되고 있다. 알코올성 간질환은 한의학에서 酒傷症의 범주에 속하는데 酒傷이 오래되어 나타나는 黃疸, 積聚, 鼓脹, 消渴, 肺痿, 哮喘, 癰疽, 酒癰, 酒瘰 등의 증상들 중에서 특히 黃疸, 積聚, 酒癰, 酒瘰, 酒積, 鼓脹은 酒傷으로 인한 간질환으로 볼 수 있으며 濕熱薰蒸型의 간질환이 많다<sup>15</sup>.

酒傷症의 治法을 살펴보면 東垣은 술의 大熱有毒함을 들어 大熱한 약으로 瀉下시키는 방법을 경계하면서 먼저 發汗시키고 다음으로 利小便하여 그 濕을 上下로 分消하는 것을 원칙으로 하고 있다.

인진호는 성미가 平苦微寒으로 무독하여 滲濕利水로 清濕熱하는 작용이 있기 때문에 風濕寒熱邪氣와 熱結黃疸에 사용한다고 하였고, 또한 “治通身發黃小便不利 除頭熱 去伏癥”라고 하였다. 이처럼 인진호는 單味로도 清熱利小便하는 효과가 우수하지만 방제구성이론에 따라 다른 약제들을 함께 사용하여 酒傷症과 같은 濕熱象으로 인해 나타나는 증상들을 치료할 수 있다.

알코올성 간질환 환자의 혈청에서는 TNF- $\alpha$ , IL-6와 IL-1 $\alpha$ 의 수치가 특이하게 상승되어 있으나 이러한 세포활성물질의 높은 수치가 간의 손상이나 또는 독성을 일으키는 원인중의 하나 인지는 분명치 않다. 최근 연구에 의하면 천문동은 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제시키고, 원지는 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 억제시켜 간세포 보호작용이 있음이 보고되었다<sup>13,14</sup>.

에탄올은 약한 전하를 띠는 분자로서 세포막 사이를 쉽게 이동하며, 혈액과 조직 사이에서 빠르게 평형을 이룬다. 에탄올은 저농도에서는 다소 행동상의 자극이 관찰되지만, 원래는 뉴런의 활성도를 감소시키는 중추신경 억제제이다

<sup>15</sup>. 에탄올에 의한 간손상 기전은 크게 에탄올 자체에 의한 경우, 아세트알데하이드와 같은 대사물질에 의한 경우, 에탄올 대사과정에서 발생한 물질에 의한 경우, 면역반응에 의한 경우 등으로 나누어 볼 수 있지만 아직도 밝혀지지 않은 부분이 많아 활발한 연구가 이루어지고 있다. 아세트알데하이드는 세로토닌, 도파민, 아드레날린과 반응하여 약리학적인 활성을 갖는 물질을 만들어 내고 이들은 세포에서 procollagen type I 과 fibronectin 합성을 촉진시키고 fibroblast를 자극하여 matrix proteins, collagen $\alpha$ 1, collagen $\alpha$ 2를 분비하게 하고 myobibroblasts collagen 합성을 촉진하여 간 섬유화를 일으킨다.

아세트알데하이드는 protein, lipid, DNA와 covalent bind를 하여 stable and unstable adducts를 형성한다. 이들은 neoantigen으로 작용하여 immune-mediated injury를 유발하여 간에 손상을 일으키게 된다. 한편 아세트알데하이드는 oxidative stress를 증가시키고 cellular glutathion (GSH)을 고갈시켜 간손상을 더욱 가중시키게 된다<sup>16</sup>. 알코올 섭취를 중단한 후에도 간질환이 계속 진행되는 이유는 면역학적인 측면으로 설명하고 있다. 알코올성 간질환에서 체액성 면역의 손상은 혈청내 면역단백질의 상승과 간내 sinusoid wall을 따라 IgA가 침착되는 것으로 알 수 있고 세포매개성 면역의 손상은 에탄올에 의해 변형된 토끼의 간 세포막 항원에 대한 항체의 생성으로 알 수 있다. 알코올성 간질환의 발생과 병의 진행에 세포독성 T 임파구와 간세포의 상호작용이 관여한다는 가설은 활동성 알코올성 간질환에서 CD4, CD8 임파구의 구성비와 임파구들의 지속적인 분포, 그리고 간세포의 major histocompatibility complex

의 발현, 알코올성 hyalin과 세포괴사와의 관계 등이 뒷받침하고 있다. Antigen stimulant의 실체는 확실하지는 않지만 Mallory's alcoholic hyaline이 주목받고 있고, 아세트알데하이드 콜라겐 복합물이 알코올성 간염의 간조직에서 발견되는데 이것은 병의 활성도와 관련이 있어 세포매개성 면역기전의 손상을 반영한다<sup>17</sup>.

세포활성물질은 다양한 기능을 가진 단백질로 일부는 림프구 계통의 세포가 생성하여 면역조절 역할을 하며 조절작용을 조절한다. TNF- $\alpha$ 를 비롯한 대부분의 세포활성물질은 target cell의 세포표면 수용기를 통하여 작용하며 작용 기전은 호르몬과 유사하다. 다른 경우에 세포활성물질은 항세포증식작용, 항미생물작용과 항종양작용이 있다. 각 세포활성물질은 고유의 독성이 있으며 TNF- $\alpha$ 는 발열, 인플루엔자 유사증상, 오심, 피곤 및 권태감을 유발할 수 있다<sup>18</sup>.

Hep G2 세포는 알코올에 의한 간의 손상을 연구하는데 아주 적합한 모델이다<sup>19-21</sup>. 본 연구에서는 인진호가 아주 효과적으로 알코올에 의한 세포손상으로부터 방어한다는 것을 밝혔다. 그러나 어떤 기작에 의해 작용하는 것인지는 아직 완전히 이해되지 않았다. Table 1과 3에서 보였듯이, Hep G2 세포에 에탄올을 처리하면 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 분비량이 농도-의존적으로 증가하고 있다는 것을 알 수 있다. 이러한 사실은 에탄올이 세포에 작용하여 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 유발했다는 것을 제시해준다. 세포손상을 일으키는데 있어 이러한 세포활성물질들의 역할을 알아보기 위하여 재조합 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 를 직접 처리한 결과 에탄올보다 조금 더 높은 세포독성을 보였다. 이러한 결과는 에탄올에 의한 세포독성을 설명하는데 있어

이러한 세포활성물질이 강력한 candidate가 될 수 있다는 것을 제시해 준다. 또한 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체를 같이 처리하였을 경우 세포독성이 감소한다는 결과도 이러한 사실을 뒷받침해주는 증거가 된다. 그러나 에탄올과 함께 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체를 같이 처리하였을 경우에 세포독성이 완전히 억제되지 않은 것은 (Fig. 2), 에탄올에 의한 세포손상에 있어 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 가 전적으로 관여하는 것이 아니라 부분적으로 관여한다는 것을 보여준다. 이러한 사실은 에탄올의 metabolic alterations도 고려하지 않을 수 없다. 흥미롭게도 본 연구에 사용한 인진호는 에탄올에 의한 세포독성과 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ 의 생성을 농도-의존적으로 현저히 감소시켰다.

이상의 결과로 보아, 에탄올에 의한 세포독성에는 아주 복잡한 과정이 관여하고, 여기에 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 가 부분적으로 기여하며, 인진호는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 억제시켜 에탄올에 의한 간세포에 대한 독성으로부터 간세포를 보호하는 것으로 보인다. 따라서 알코올에 의한 간손상의 예방에 인진호가 어느 정도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

인진호가 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 분비를 억제하는지를 알아본 결과 다음과 같은 결과들을 얻었다.

에탄올은 Hep G2 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 증가시켰고 Hep G2 세포에서 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 유의성 있게 증가시켰다. 에탄올로 인한 Hep G2 세포의 세포독성은 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 에 대한 항체 처리에 의해 부분적

으로 억제되었다.

인진호는 Hep G2 세포에서 에탄올에 의한 TNF- $\alpha$ 의 합성증가를 유의성있게 억제시키면서 IL-1 $\alpha$ 의 합성증가를 유의성있게 억제시켰다. 그리고 인진호는 에탄올에 의한 세포독성을 유의성있게 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때 인진호는 에탄올에 의해 증가되는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 생성을 억제시킴으로써, 에탄올에 의한 간세포의 독성작용을 억제하여 간세포를 보호하는 것으로 보여진다. 그러나 에탄올에 의한 세포독성이 오직 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 에 의해서만 이루어지는 것이 아니고 다른 복잡한 과정들이 관여한다고 생각되며, 또한 인진호가 어떤 기전으로 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 에 대한 생성을 억제하는 지에 대한 연구는 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## VI. 參 考 文 獻

1. 全國韓醫大 肝系內科學教室. 肝系內科學. 서울: 동양의학연구원; 1992, p.26, 28, 33, 111, 112, 165, 178, 230, 254, 272, 525, 563, 564, 572, 598
2. 辛民教. 原色 臨床本草學. 서울: 永林社; 1994, pp.323~324
3. McClain, C. J., and Cohen, D. A. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 9:1989, pp.349~351
4. Deviere, J., Content, J., Denys, C., Vandebussche, P., Schandene, L., Wybran, L., and Dupont, E. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 11: 1990, pp.628~634
5. Khoruts, A., Stanke, L., McClain, C. F., Logan, G., and Allen, J. I. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentration in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13: 1991, pp.267~276

6. Sheron, N., Bird, G., Goka, J., Alexander, G., and Williams, I. L. Elevated plasma interleukin-6 and increased severity and mortality in alcoholic hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 84: 1991, pp.453~499
7. Mckiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute phase proteins. *J. Immunol.* 149: 1992, pp.2021~2027
8. Healy, A. M., and Gelehrter, T. D. Introduction of plasminogen activator inhibitor-1 in Hep G2 human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J. Biol. Chem.* 269: 1994, pp.19095~19100
9. 김정섭. 脂肪肝方이 Ethanol로 유도된 脂肪肝 및 간재생능에 미치는 영향, 대한한방내과학회지 1998; 19(1): pp.3~21
10. 권현진. 알콜 투여에 의한 쥐 뇌 및 간의 주요 대사에 미치는 인삼 추출물의 효과, 충남대 대학원, 1993
11. 大田大學校韓醫科大學 第五期卒業準備委員會. 東垣脾胃論譯釋, 서울: 大星文化社; 1992, pp.195-196
12. 李時珍. 本草綱目 上, 北京: 人民衛生出版社; 1982, p.942
13. 전영세. Hep G2세포에서 에탄올 세포독성의 IL-1 $\alpha$  분비에 있어 원지의 억제효과, 원광대학교 대학원, 1999
14. 김종철. Hep G2 세포에서 에탄올 세포독성의 IL-1 $\alpha$  분비에 있어 원지의 억제효과, 원광대학교 대학원, 1999
15. Kurt J. Isselbacher. HARRISON S 내과학2권 (한글제1판), 서울: 정담; 1997, p.2613
16. David Zakim, Thomas D. Boyer, eds, *Hepatology*, 3th ed, W.B. Saunders company, Philadelphia: 1996
17. Sheila Sherlock, James Dooley, eds, *Diseases of the Liver and Biliary System*, 10th ed, Science Publications Center Inc. Seoul: 1996
18. Bertam G. Katzung. 임상약리학, 서울: 한우리; 1998, pp.1057~1059
19. Neuman, M. G., Koren, G., and Tiribelli, C. In vitro assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on Hep G2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 1993, pp.932~941
20. Neuman, M. G., Cameron, R. G.,

Shear, N. H., Bellentani, S., and Tiribelli, C. Effect of taurour sodeoxy cholic acid and ursodeoxy cholic acid on ethanol-induced cell injuries in the

human Hep G2 cell line. *Gastroenterology* 109: 1995, pp.555~563  
21. Cameron, R. G, Neuman, M. G., Shear, N. H., Katz, G., Bellentani, S.,

and Tiribelli, C. Modulation of liver-specific cellular response to ethanol in vitro in Hep G2 cells. *in Vitro Toxicol.* 12: 1998, pp.1~29