

원 저

茵陳清肝湯이 C형 간염 바이러스의 임파구계 세포감염에 미치는 영향

김 선 민, 이 장 훈, 우 흥 정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effect of *Injinchunggan-tang* on Hepatitis C Virus Infection

Sun-Min Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

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

Objective : The aim of this study was to evaluate the efficacy of *Injinchunggan-tang* on Hepatitis C virus infection, and to clarify the mechanism of treatment by indentifying the effect of *Injinchunggan-tang* on cytokine secretion.

Methods : In vitro model of HCV infection in MOLT 4 cell was used. The effect of *Injinchunggan-tang* on the attachment of HCV on MOLT 4 cell was studied by PCR method. The change of cytokine secretion according to *Injinchunggan-tang* treatment was investigated by ELISA.

Results : *Injinchunggan-tang* inhibited the attachment of HCV on MOLT4 in the concentration of 10-2 μ g/ μ l and 10-1 μ g/ μ l. In cytokine assay, *Injinchunggan-tang* increased the secretion of IL-4 of mouse splenocytes and PBMC in 48 hour culture as well as the secretion of IL-12 of mouse splenocytes and PBMC in 48 hour culture, whereas it decreased the secretion of IFN- γ of mouse splenocytes in 24 and 48 hour culture.

Conclusion : The results of this study show that *Injinchunggan-tang*(茵陳清肝湯) has an inhibitory effect on the attachment on HCV on Molt4 Cell, and that it increases the secretion of IL-4 and IL-12 of mouse splenocyte and PBMC. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(1):53-62)

Key Words: *Injinchunggan-tang*, Molt4, cytokine, splenocyte, PBMC

서 론

C형 만성간염은 C형 간염 바이러스(HCV)의 지속 감염을 원인으로 하는 만성질환으로 장기간에 걸쳐

간경변증, 간세포암으로 이행하는 것으로 알려져 있다^{1,2}. 전세계 인구의 약 1억7천만(3%)이 HCV carrier 상태로 추정되며³, 그 중 많은 수에서 체내 바이러스의 증식 및 생산이 계속해서 일어나고 있는 지속감염의 상태로서 HCV의 감염환자의 치료 및 대책은 현 의학계의 중요한 과제 중 하나이다.

C형 바이러스성 간염은 주로 經注的 경로에 의해 감염이 일어나며⁴, 감염후 70%이상에서 만성화되어, 이 중 약 20%가 간경변증으로 진행되고, HCV에 감

· 접수 : 2001년 2월 13일 · 채택 : 3월 1일
· 교신저자 : 김선민, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118, E-mail: sunnytky@Yahoo.co.kr)

염된 환자가 20년 후에 간세포암으로 발증할 가능성은 약 1-5%에 이른다²⁵⁾.

한의학에서 간장질환은 黃疸, 脇痛, 積聚, 鼓脹, 酒傷, 勞倦傷 등에 속하며⁶⁾, 이 중에서 바이러스성 간염은 주로 黃疸과 관련하여 살펴볼 수 있다. 內經에서⁷⁾ 黃疸에 대한 최초의 기록을 볼 수 있고, 張⁸⁾은 黃疸의 주원인을 濕熱로 보아 淸熱利濕의 처방을 도모하였고, 대표적인 치료처방으로 茵陳五苓散을 제시하였다.

茵陳淸肝湯은 張⁹⁾이 濕熱黃疸의 치료에 사용한 茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고 地榆, 靑皮, 羅覆子, 覆盆子, 甘草를 加味한 方劑로 臨床에서 바이러스성 만성간질환의 치료에 淸熱利濕을 목표로 활용되고 있는 처방이다. 茵陳淸肝湯에 대한 연구를 살펴보면 金⁹⁾의 마우스 간염바이러스로 유발된 전격성간염의 생존률 향상에 대한 보고, 禹¹⁰⁾의 만성B형간염 환자에 대한 임상연구, 金¹¹⁾의 안전성에 관한 연구, 姜¹²⁾의 간경변증에 대한 효용성, 朴¹³⁾의 간세포 보호작용, 金¹⁴⁾의 B형 간염 바이러스 단백질현역제에 대한 연구, 姜¹⁵⁾의 Anti-HCV 역가 변화에 대한 연구 등이 있다.

저자는 한약재가 C형 바이러스성 간염에 미치는 효과 및 치료기전을 연구하고자 인간 임파구계 세포인 Molt4 세포에 HCV를 감염시키는 in vitro 실험 모델을 이용하여^{16,17)}, 茵陳淸肝湯이 C형 간염 바이러스 감염에 미치는 영향과 IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ 등의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 실험적으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1)세포

본 실험에서는 인간 임파구계 세포인 Molt4 세포주를 사용하였다.

2)동물

10주령 BALB/c 마우스 암컷 5마리를 24±2℃ 무균실험실내에서 4주간 하나의 케이지 내에서 자유섭식 시키면서 사육한 후 비장 및 peripheral blood

mononuclear cell(PBMC)를 채취하였다.

3)한약재

본 실험에서는 경희의료원 한방병원에서 사용하는 약재를 사용하였으며, 한방병원에서 발행한 경희한방처방집에 근거하여 茵陳淸肝湯 3첩을 준비하여 검액 조제의 재료로 하였다. 처방 내용 및 1첩당 분량은 아래 표와 같다.

Prescription of Injinchunggan-tang

Herbs	Botanical Name	Dose (g)
茵陳	<i>Artemisiae Caillaris Herba</i>	50
地榆	<i>Sanguisorbae Radix</i>	15
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	12
白茯苓	<i>Hoelen</i>	12
豬苓	<i>Ployporus</i>	12
覆盆子	<i>Rubi Rrusctus</i>	12
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	8
蘿藦子	<i>Raphani Semen</i>	8
靑皮	<i>Aurantii Immatri Pericarpium</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
Total amount		141(g)

4) 검액의 조제

5,000ml Round Flask에 3첩 분량(423g)의 약재를 넣고, 3,000ml의 증류수를 가하여 냉각 환류 추출기를 이용하여 2시간 가열 추출한 다음, 여과지로 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-A, Alpha 1/4, Germany)를 이용하여 건조시켰다(수율 : 22.1%). 실험에 사용하기 전에 건조된 한약 추출물 1mg을 증류수 1ml에 녹인 후 세포 오염을 방지하기 위하여 0.45m syringe filter(Millex-GS, Millipore, Co., U.S.A.)로 여과한 후 사용하였다.

5) 프라이머 제작

HCV의 9.6Kb 중에서 out primers로는 23(5' ACTCCACCATAGA TCACTCC3', Sense)~351R(5' TTGTGCTCAT GGTGCACG3', Antisense), inner primers로는 37(5' CACTCCCCGTGTGAGGAACTACTG3', Sense) ~346R(5' CTCATGGTGCACGGTCTACGAGACC3', Antisense)를 이용하였다.

2. 방법

1)세포배양액 제조 및 세포배양

세포배양액 RPMI1,640 450 ml에 fetus bovine serum(FBS) 50 ml, streptozotocin, penicilin, anti-fungal agent를 각각 1% 농도가 되도록 첨가하여 제조하였다. 인간 임파구계 세포인 Molt4세포를 24well plate를 이용하여 각 well에 세포수가 3×10^5 이 되도록 조정하여 분주하였다. 세포는 세포배양기내에서 CO₂ 5%, 37℃ 환경내에서 배양하였다.

2) 적정약물처리농도 결정

茵陳清肝湯의 농도에 따른 세포독성을 알아보기 위해, Molt4세포를 96 well plate에 3×10^5 /well 이 되도록 각 well당 100 μl씩 seeding 한 후 茵陳清肝湯 extract를 각각 0 μg/μl, 10⁻⁶ μg/μl, 10⁻⁵ μg/μl, 10⁻⁴ μg/μl, 10⁻³ μg/μl, 10⁻² μg/μl, 10⁻¹ μg/μl 및 10⁰ μg/μl 농도로 처리하였다. CO₂ 5%, 37℃ 환경의 세포배양기 내에서 48 시간 동안 배양한 후 alamar blue용액을 각각의 well에 100 μl 가하여 다시 한번 같은 조건의 세포배양기 내에서 4시간동안 培養하였다. 4시간 후 alamar blue 용액이 밝은 보라색으로 변하면, plate reader를 이용하여 540nm에서 optical density(O.D.)를 측정하였다.

3) 약물처리

인간 임파구계 세포인 Molt4 세포를 24 well plate에, 각 well에 세포수가 3×10^5 이 되도록 조정하여 분주하였다. 茵陳清肝湯 extract를 각각 0 μg/μl, 10⁻³ μg/μl, 10⁻² μg/μl, 10⁻¹ μg/μl 농도로 가하여 48시간 동안 37℃, CO₂ 5% 환경의 세포배양기 내에서 배양하였다.

4) Molt 4에 HCV 흡착

HCV에 감염된 환자의 혈청을 취하여 비동화시키지 않은 상태에서 최종농도가 0.01%, 0.001%가 되도록 茵陳清肝湯 extract를 가하여 48시간동안 배양한 세포군에 각각 접종시켰다. 접종 2시간 후에 각 세포군을 microtube에 담아, 원심분리하여 세포만을 취하였다. 세포막에 비특이적으로 부착되어 있는 바이러스를 제거하기 위해 1 ml phosphate buffered saline (PBS)로 5회 세척한 후, 상청액을 버리고 세포만을 보관하였다.

5) RNA 추출

RNA의 추출에는 Piotr C. 등의 Single-step method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-

Phenol-Chloroform Extration법¹⁹⁾을 상품화한 ISOGEN(일본) 1 ml을 세척 후 원심분리를 통해 회수한 세포에 가하여 상온에서 5분간 방치하였다. 5분후 chloroform 0.2 ml을 가하여 15초간 세계 흔들어 준 다음, 다시 한번 상온에서 2-3분간 방치한 후, 4℃, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상청액만을 취하여, isopropanol 0.5 ml를 가한 후 상온에서 5-10분간 방치한 후 4℃, 12K×g에서 10분간 원심분리하였다. pellet만을 남기고 상청액을 모두 버리고, 다시 한번 75% ethanol을 가하여 vortex한 후 4℃, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 완전히 건조시킨 후 증류수를 가하여 cDNA제작에 이용하였다.

6) cDNA제작

분리한 RNA가 완전히 건조된 후 각 tube당 11 μl의 증류수를 가하여 완전히 용해시켰다. 65℃ warming bath내에서 5분간 가열한 후 20M의 outer primer mix 5 μl를 가하고, 70℃에서 10분간 다시 한번 가열한 후 RT mixture(Pharmacia Biotech) 9 μl를 가하고 37℃에서 1시간 90℃에서 5분간 incubation하였다.

7) RT-PCR

① PCR mixture 제조

Pharmacia Biotech사 생산의 10 Buffer 7.5 μl, 20M outer primer mix 2.5 μl, 증류수 64 μl, Tag polymerase 1.0 μl를 혼합하여 1st PCR에 이용할 PCR mixture를 준비하였다.

또한 2nd PCR에 필요한 PCR mixture는 동사의 10 Buffer 9.0 μl, 20M inner primer mix 2.5 μl, 20M dNTP mix 8.0 μl, 증류수 69.5 μl, Tag polymerase 1.0 μl을 혼합하여 준비하였다.

② 1st PCR과정

각 sample당 제작된 cDNA를 template로 하여, 1st PCR mixture(Pharmacia Biotech) 75 μl를 가한 후 thermal cycler(Hitachi, Japan)를 이용하여 94℃에서 1분간, 42℃에서 1.5분간, 72℃에서 3분간 30 cycles을 증폭하였다.

③ 2nd PCR과정

1st PCR의 생성물에서 10 μl를 취하여 2nd PCR

mixture 90 μ l를 가한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간, 42 $^{\circ}$ C에서 1.5분간, 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 20cycles을 증폭하였다.

8) Agarose gel 준비 & DNA확인

상기의 PCR 생성물 각각을 1.5% agarose gel에 100V에서 1시간 동안 전기영동하여 SYBR Green I nucleic acid gel stain(Probe사)20 μ l를 가하여 DNA를 염색한 후 Illuminator상에서 band를 확인하고 polaroid사진기로 촬영하였다.

9) 비장세포 분리

바이러스 감염시 방어 작용중에서 중요한 역할을 담당하고 있는 인터페론의 생성에 대한茵陳淸肝湯의 유효성을 확인하기 위하여 10주령 BALB/c 마우스 네마리를 단두로 희생시킨 후, 비장을 추출하여 PBS용액 내에서 조직을 멸균된 슬라이드글래스로 homogenization하였다. 그 후, 멸균된 여과지로 여과하고, 세포 혼탁액 10ml을 Ficoll-Conray 용액 10ml에 중층시켜, 2,300rpm으로 25분간 실온에서 원심분리시켰다. Tris-NH₄Cl hemolysis buffer로 적혈구를 용해한 후 PBS로 3회 세척하였다. 세포수 2,106 cell/ml로 조정하여 RPMI 10% FBS배지를 넣고,茵陳淸肝湯을 10⁻² μ g/ μ l, 10⁻¹ μ g/ μ l 농도로 첨가하여 anti-mouse CD3eAb(5 μ g/ml)로 자극하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 각각 24, 48시간동안 배양하였다. 이후 세포액을 회수하여 1,500 pm으로 원심분리시키고 상청액을 회수하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하고, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ 를 측정하기 위한 ELISA실험에 이용하였다.

10) PBMC 분리

10주령 BALB/c 의 PBMC를 회수하기 위하여, mouse의 혈액을 모아 동량의 Ficoll-pague 용액으로 상기와 같은 방법을 이용하여 PBMC를 회수하였다. 임파구층인 중간층을 회수하여 PBS로 3회 세척하고, 세포수 2,106 cell/ml로 조정하여 RPMI 10% FBS배지를 넣고,茵陳淸肝湯을 10⁻¹ μ g/ μ l 농도로 첨가하고 anti-mouse CD3e Ab(5 μ g/ml)로 자극하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 48시간동안 배양하였다. 48시간 후 세포액을 회수하여 1,500 pm으로 원심분리시키고 상청액을 회수하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하고, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ 를 측정하기 위한 ELISA실험에 이용하였다.

11) IL-4 측정

제작자의 매뉴얼에 따라 희석액을 만들고, 희석된 표준액과 검액 50 μ l를 96well plate에 가한 후, 50 μ l의 biotinylated anti-IL-4 용액을 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation한 후 세척액으로 4회 씻어내었다. Streptavidin-HRP working solution을 100 μ l/well 비율로 처리하고 실온에서 1시간 방치한 후 4회 세척하였다. 이후 stabilized chromogen을 100 μ l/well 비율로 처리하고, 빛이 들어가지 않는 어두운 장소에서 실온에 25분간 방치한 후 파란 반응색을 확인하고 반응정지용액을 100 μ l/well 처리하고 ELISA reader로 O.D. 450nm에서 측정하였다.

12) IL-10 측정

제작자의 매뉴얼에 따라 제작한 표준액과 검액 100 μ l를 96well plate에 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation한 후 세척액으로 4회 세척하였다. 각 well에 biotinylated anti-IL-10 100 μ l를 가하고 상온에서 1시간 incubation한 후 세척액으로 4회 씻어내었다. Streptavidin-HRP working solution을 100 μ l/well 비율로 처리하고 실온에서 30분 방치한 후 4회 세척하였다. 이후 stabilized chromogen을 100 μ l/well 비율로 처리하고, 빛이 들어가지 않는 어두운 장소에서, 실온에 25분간 방치한 후 파란 반응색을 확인하고 반응정지용액을 100 μ l/well 처리하고 ELISA reader로 O.D. 450nm에서 측정하였다.

13) IL-12 측정

제작자의 매뉴얼에 따라 희석된 표준액 100 μ l를 흡착 96well plate에 가하였다. 50 μ l의 biotinylated anti-IL-12를 100 μ l/well 비율로 가하고 상온에서 두 시간 동안 방치한 후 세척액으로 4회 세척하고, streptavidin-HRP working solution을 100 μ l/well 비율로 처리하고 실온에서 30분간 방치한 후 4회 세척하였다. 이후 stabilized chromogen을 100 μ l/well 비율로 처리하고, 빛이 들어가지 않는 어두운 장소에서 실온에 30분간 방치한 후 반응색을 확인하고 반응정지용액을 100 μ l/well 처리하고 ELISA reader로 O.D. 450nm에서 측정하였다.

14) IFN- γ 측정

500pg/ml에서 0pg/ml까지 제작자의 매뉴얼에 따라 표준액을 만든 후, 희석된 표준액과 검액 100 μ l를 함께 흡착 96well plate에 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation한 후 세척액으로 4회 세척하였다. Biotinylated anti-IFN- γ 를 100 μ l/well 비율로 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치한 후 세척액으로 4회 세척하였다. streptavidin-HRP working solution을 100 μ l/well 비율로 처리하고 실온에서 30분간 방치한 후 4회 세척하였다. 이후 stabilized chromogen을 100 μ l/well 비율로 처리하고, 빛이 들어가지 않는 어두운 장소에서 실온에 30분간 방치한 후 반응색을 확인하고 반응정지용액을 100 μ l/well 처리하고 ELISA reader로 O.D. 450nm에서 측정하였다.

15) 통계처리

이 실험결과는 Student's t-test에 의하여 통계적 처리를 하였으며, P<0.05 수준 이상인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. Alamar Blue assay

茵陳清肝湯의 농도에 따른 세포독성을 알아보기 위해, 3 \times 10⁵/well Molt4세포에 각각 0 μ g/ μ l, 10⁶ μ g/ μ l, 10⁵ μ g/ μ l, 10⁴ μ g/ μ l, 10³ μ g/ μ l, 10² μ g/ μ l, 10¹ μ g/ μ l 및 1 μ g/ μ l 농도로茵陳清肝湯을 처리한 결과茵陳清肝湯 10⁶ μ g/ μ l, 10⁵ μ g/ μ l, 10⁴ μ g/ μ l, 10³ μ g/ μ l, 10² μ g/ μ l 및 10¹ μ g/ μ l 농도에서 세포독성 작용이 없는 것으로 나타났다(Table 1).

2.茵陳清肝湯 이 HCV의 Molt4 세포 흡착 억제에 미치는 영향

茵陳清肝湯을 10³ μ g/ μ l, 10² μ g/ μ l 및 10¹ μ g/ μ l 농도로 가하여 48시간 동안 배양한 세포에 4시간 동안 HCV 감염 혈청 접종 후 세포로부터 추출한 RNA 검출 결과,茵陳清肝湯이 농도의존적으로 HCV의 Molt 4 세포로의 흡착억제작용이 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

3.茵陳清肝湯이 IL-4 분비에 미치는 영향

10² μ g/ μ l, 10¹ μ g/ μ l 농도의茵陳清肝湯을 BALB/c 마우스의 splenocyte에 첨가하여 anti-mouse CD3eAb(5 μ g/ml)로 자극한 후, 각각 24시간, 48시간동안 배양한 배양액 내의 IL-4 분비변화 및 BALB/c 마우스의 PBMC를 분리하여 anti-mouse CD3eAb(5 μ g/ml)첨가하여 10¹ μ g/ μ l 농도의茵陳清肝湯 배양액으로 48시간 배양한 배지내 IL-4 분비변화를 검토한 결과, IL-4 분비촉진효과를 관찰할 수 있었다(Table 2).

4.茵陳清肝湯이 IL-10 분비에 미치는 영향

10² μ g/ μ l, 10¹ μ g/ μ l 농도의茵陳清肝湯을 BALB/c 마우스의 splenocyte에 첨가하여 anti-mouse

Table 1. The Viability of Molt4 according to the Treatment of Injinchunggan-tang

Concentration of Injinchunggan-tang	O.D.
Injinchunggan-tang 0 μ g/ μ l(Normal control)	0.387 0.021 ^{a)}
Injinchunggan-tang 1 μ g/ μ l	0.250 0.042*
Injinchunggan-tang 10 ¹ μ g/ μ l	0.387 0.029
Injinchunggan-tang 10 ² μ g/ μ l	0.396 0.021
Injinchunggan-tang 10 ³ μ g/ μ l	0.392 0.025
Injinchunggan-tang 10 ⁴ μ g/ μ l	0.392 0.014
Injinchunggan-tang 10 ⁵ μ g/ μ l	0.382 0.024
Injinchunggan-tang 10 ⁶ μ g/ μ l	0.367 0.046

a); Mean Value of O.D. Standard Deviation

; Statistically significant compared with Normal Control(, P < 0.05)

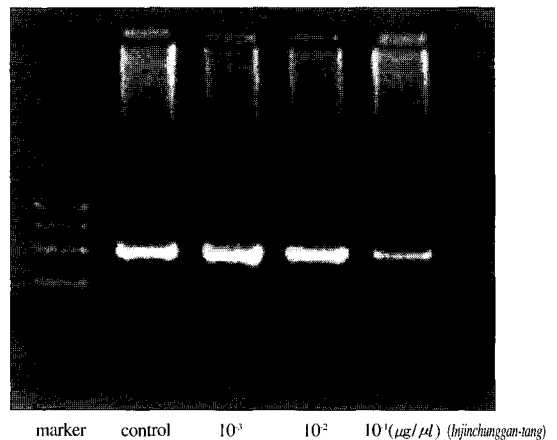


Fig. 1. The Inhibitory effect of Injinchunggan-tang on the attachment of HCV on Molt4 cell

Table 2. The Effect of *Injinchunggan-tang* on the Secretion of IL-4 in BALB/c Splenocyte and PBMC

Concentration of <i>Injinchunggan-tang</i>	IL-4 (pg/ml)	
24hrs Control	8.04	0.64 ^{a)}
24hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ² µg/µl	8.27	0.41
24hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ¹ µg/µl	9.05	0.70
48hrs Control	40.63	0.69
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ² µg/µl	61.25	0.51*
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ¹ µg/µl	68.75	0.34*
48hrs PBMC Control	7.30	0.68
48hrs PBMC 10 ¹ µg/µl	9.63	0.58*

a) ; Mean Value of O.D. Standard Deviation

, # ; Statistically significant compared with Control Data(: P < 0.05 #; P < 0.01)

Table 4. The Change of the Secretion of IL-12 in Splenocyte and PBMC according to the Treatment of *Injinchunggan-tang*

Concentration of <i>Injinchunggan-tang</i>	IL-12 (pg/ml)	
48hrs Control	5.43	1.43 ^{a)}
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ² µg/µl	6.01	0.98
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ¹ µg/µl	7.31	1.32*
48hrs PBMC Control	10.23	1.97
48hrs PBMC 10 ¹ µg/µl	13.45	2.01*

a) ; Mean Value of O.D. Standard Deviation

* ; Statistically significant compared with Control Data(*: P < 0.05)

CD3eAb(5µg/ml)로 자극한 후, 각각 24시간, 48시간 배양한 배양액 내의 IL-10 분비변화 및 BALB/c의 PBMC를 분리하여 anti-mouse CD3eAb(5µg/ml)첨가하에 10¹µg/µl 茵陳淸肝湯 배양액으로 48시간 배양한 배지내 IL-10 분비변화를 검토한 결과, 통계적으로 유의성있는 결과가 보이지 않았다(Table 3).

5. 茵陳淸肝湯이 IL-12 분비에 미치는 영향

10²µg/µl, 10¹µg/µl 농도의 茵陳淸肝湯을 BALB/c 마우스의 splenocyte에 첨가하여 anti-mouse CD3eAb(5µg/ml)로 자극한 후 24시간, 48시간 동안 배양한 배양액 내의 IL-12 분비변화를 검토한 결과, 24시간 배양군 전체에서 IL-12분비를 거의 확인할 수 없었으며(data not shown), 48시간 배양군 중 10¹µg/µl 농도의 茵陳淸肝湯 처리군에서 IL-12 분비촉진을 관찰할 수 있었다. 또한 BALB/c의 PBMC를 분리

Table 3. The Change of the Secretion of IL-10 in Splenocyte and PBMC according to the Treatment of *Injin chunggan-tang*

Concentration of <i>Injinchunggan-tang</i>	IL-10 (pg/ml)	
24hrs Control	15.61	2.54 ^{a)}
24hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ² µg/µl	14.98	5.75
24hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ¹ µg/µl	15.60	5.01
48hrs Control	657.12	80.23
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ² µg/µl	598.12	57.12
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ¹ µg/µl	652.34	63.22
48hrs PBMC Control	399.03	21.11
48hrs PBMC 10 ¹ µg/µl	411.50	29.44

a) ; Mean Value of O.D. Standard Deviation

Table 5. The Change of the Secretion of IFN- in Splenocyte and PBMC according to the Treatment of *Injinchunggan-tang*

Concentration of <i>Injinchunggan-tang</i>	IFN (pg/ml)	
24hrs Control	80.13	5.09 ^{a)}
24hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ² µg/µl	68.45	4.03
24hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ¹ µg/µl	64.52	2.90*
48hrs Control	196.11	7.99
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ² µg/µl	160.06	5.01
48hrs <i>Injinchunggan-tang</i> 10 ¹ µg/µl	127.30	6.10*
48hrs PBMC Control	294.32	4.34
48hrs PBMC 10 ¹ µg/µl		

하여anti-mouse CD3e Ab(5µg/ml)첨가하에 10¹µg/µl 농도의 茵陳淸肝湯 배양액으로 48시간 동안 배양한 배지의 IL-12 분비에서도 IL-12의 상승을 관찰할 수 있었다(Table 4).

6. 茵陳淸肝湯이 IFN-γ분비에 미치는 영향

10²µg/µl, 10¹µg/µl 농도의 茵陳淸肝湯을 BALB/c 마우스의 Splenocyte에 첨가하여 anti-mouse CD3eAb(5µg/ml)로 자극한 후, 각각 24시간, 48시간 배양한 배양액 내의 IFN-γ분비변화를 검토한 결과, 茵陳淸肝湯 10¹µg/µl 농도에서 24시간, 48시간 배양시 IFN-γ 분비억제를 보였다. 또한, BALB/c 마우스의 PBMC를 분리하여 anti-mouse CD3eAb(5µg/ml) 첨가하에 10¹µg/µl 농도의 茵陳淸肝湯 배양액으로 48시간 동안 배양한 배지의 IFN-γ 분비변화를 검토한 결과, 통계적으로 유의하지는 않았으나 억제경향을 보

였다(Table 5).

고 찰

C형 간염 바이러스는 flaviviruses에 속하는 single stranded RNA 바이러스로서 약 9.4kb(9,379) RNA 유전자를 가지고 있으며, 이 유전자는 core 단백질과 함께 nucleocapsid를 형성하고 있다. 이 nucleocapsid는 지질 2중층과 두 종류의 envelop 단백질로 이루어진 envelop에 의해 싸여 있다²¹⁾.

C형 간염 바이러스는 대표적으로 1a, 1b, 2a, 2b, 3a 등 적어도 6개 이상의 genotypes을 지니고 있으며²³⁾, 이중 1b 타입에 감염시 혈중 HCV RNA 수치가 높고, 인터페론 치료에 반응이 더딘 것으로 보고되고 있다²⁴⁾. 또한 type 1, 2, 3은 주로 일본지역, 서유럽과 북아메리카에 많고, type 4는 중북부 아프리카 및 중동에 많이 보이며, type 5는 남아프리카에, type 6은 동남아시아에 많은 것으로 보고되고 있다²⁴⁾. C형 간염 바이러스가 감염을 일으키는 기전에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다. HBV에 비해 HCV는 혈중 바이러스 농도가 낮아서 바이러스 자체를 직접 검출하는 것은 PCR법이 개발된 후에야 비로소 가능하게 되었다. 바이러스 증식 수준의 지표인 HCV RNA 역가와 간손상 정도의 지표인 ALT사이에는 유의한 상관관계가 없다는 보고²⁵⁾를 볼 때 만성 C형 간염에 있어서 바이러스의 직접적인 세포 독성이 간손상의 가장 중요한 기전은 아닐 것이라는 점을 시사하는 것으로 보이며, 이는 바이러스 증식 수준과 간손상의 정도 사이에 뚜렷한 상관관계가 없음을 뜻한다.

혈청 IgM anti-HCV core level과 혈청 ALT치와의 상관관계에 대한 연구에서는 이 항체가와 ALT치 사이에 통계적으로 상당히 유의한 상관관계가 있음을 보고하여 간염의 생성기전에 면역기전의 관여 가능성을 시사하고 있다²⁶⁾.

한약재의 C형 간염 치료 효용성에 대한 임상보고로서는 姜 등¹⁵⁾의 보고가 있고, 실험적 연구는 아직 보고된 바 없다. 丁 등¹⁶⁻¹⁸⁾은 人蔘養榮湯 및 小柴胡湯을 이용하여 치료 가능성을 제시하는 임상보고 및

실험보고를 한 바 있다.

C형 간염의 치료에 있어서 서양의학적으로는 현재까지 오직 한가지의 표준화된 치료법이 있을 뿐이며, 이는 interferon- α 이다^{1,29)}. 지금까지 인터페론의 치료효과에 대한 보고는 수 없이 많이 있었으나, 치료에 반응하는 반응율이 충분하지 못하고 치료에 따른 부작용으로 새로운 치료법이 요구되고 있다. 1997년 미국 NIH에서는 인터페론에 대한 추가적 연구와 이의 대체요법 도입의 필요성을 발표한 바 있다³⁰⁾.

In vitro 실험을 응용한 C형 간염 바이러스 억제에 대한 서양의학적 연구로서는 인터페론^{5,31)} 외에도 dextran sulfate³²⁾, amantadine³¹⁾, suramin³³⁾ 등을 사용한 보고가 있다.

C형 간염의 양태를 조사하기 위한 임상보고로서는, A형 또는 B형 간염 바이러스성 간염에 비해 진단 방법이 비교적 늦게 개발되었고, 항원자체를 직접 검사하는 진단법이 아직 없으므로, 대리 표식자로서 anti-HCV를 이용하여 간효소치와 바이러스와의 관계를 알아보려 하는 임상 추적조사에서 바이러스 역가와 상관없다고 보고^{26,34)}되고 있으며, PCR법을 이용한 유전자의 증폭 검사²⁷⁾ 및 이를 바탕으로 한 역학조사가 보고되고 있다.

C형 간염에 대한 연구를 분류관찰하면, HCV가 간염을 형성하는 기전에 대한 연구^{35,36)}와, HCV감염의 진단법 및 정량적 진단법의 진전을 위한 연구²⁷⁾, 약물 치료 효과에 대한 보고²⁸⁾, 백신 개발 연구²⁰⁾ 등으로 분류할 수 있으며, 간염 형성 기전을 밝히려는 시도로서 임상연구와 더불어 세포를 이용한 in vitro 환경에서 HCV 감염을 일으켜 관찰하는 연구^{16-18,32,37-39)} 등을 살펴볼 수 있다.

HCV는 1989년 그 유전자 단편이 처음 발견된 후로 바이러스의 특징을 알아내고자 하는 많은 시도가 있어 왔으나, 알려진 동물 실험 모델이 없고, 극히 제한된 in vitro 실험을 통해서만이 가능한 상태이다. 이에 본 실험에서는 HCV의 in vitro 감염 모델중에서 가장 안정성이 높다고 판단되는 임파구체 세포에의 감염 모델을 이용하여 茵陳清肝湯의 C형 간염 바이러스 억제 효과를 관찰하였다.

T helper(Th) 세포는 사이토카인 분비에 따라 Th1, Th2 림프구로 분류하고 있으며, Th1계 사이토카인으로는 IL-2, IL-12, IFN- γ 가 있고, Th2계 사이토카인으로는 IL-4, IL-5, IL-10 등이 있다.茵陳淸肝湯이 면역계의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 고찰하기 위해, Th1계 사이토카인으로서 인터페론과 IL-12, Th2계 사이토카인으로서 IL-4, IL-10을 선택하여, BALB/c 마우스의 비장세포에茵陳淸肝湯 처리시 변화를 통해 면역계의 반응을 간접적으로 살펴보았다. Th1 사이토카인의 주요작용으로는 암세포의 제거, 세포내 감염의 제거 등을 들 수 있으며 이의 과민반응으로는 조직 이식거부반응, 당뇨병, 류마티즘 등이 있고, Th2 사이토카인의 주요작용으로는 항체생성의 활성화를 통하여 병원미생물, 원충, 기생충 감염시 이러한 병원의 퇴출 등을 들 수 있으며, 과민반응으로 대표적인 질환으로는 알러지, 천식, 아토피 등이 있다. Th1은 세포성 면역반응에 작용하고, Th2는 주로 체액성 면역반응에 관여하고 있다고 생각할 수 있다. 본 실험에서는茵陳淸肝湯 처리에 의해 Th1 사이토카인인 IL-12의 분비량이 증가하였다. C형간염 바이러스에 의한 사이토카인 분비변화에 대한 실험으로는 HCV에 의해 natural killer cytotoxic activity가 감소되었다는 보고³⁸⁾가 있으며, IL-12는 Th1 면역을 도입하는 처음 단계의 사이토카인으로서, IL-12의 분비증가는 natural killer cell(NK cell)의 활성화를 가져와 바이러스 제거에 기여할 가능성이 있다. 또한 장기적으로는 IFN- γ 의 분비를 유도한다³⁹⁾. 본 실험성적은 비록 Th1계의 IL-12 분비가 증가하기는 하였으나 IFN- γ 의 분비량이 감소하고 IL-4 분비량이 현저히 증가하였으므로,茵陳淸肝湯 은 Th1에 치우친 면역반응을 Th2로 끌어올려 면역계의 밸런스를 맞추는 효과가 있다고 생각할 수 있다. 이는 임상적으로 과도한 Th1 임파구의 활동으로 간세포 상해가 심하여 간효소치가 높아진 환자에서茵陳淸肝湯 복용 후 간효소치의 저하 임상보고¹²⁾를 통하여 간접적으로 확인할 수 있다. 그러나 IL-12 분비가 증가되었으므로, Th2 계의 절대적인 유도라고 보기에는 어려운 점이 있다. Th1 면역계에 비해 Th2 면역에 치우쳐진 환자

에서는 오히려 Th1 면역계를 향상시키는 등 Th1-Th2면역 밸런스 조절기능을 나타낼 가능성을 배제할 수 없다. 한약의 이러한 상대적 면역조절기능은 발표된 바 있다⁴⁰⁾.

바이러스의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있는 IFN- γ 의 분비가 억제된 것으로 보아茵陳淸肝湯이 바이러스를 직접적으로 억제하지는 않는 것으로 보인다. 다만茵陳淸肝湯의 HCV의 Molt4 세포로의 흡착 억제 작용은 임파구의 세포막 단백 발현 변화로 인한 바이러스의 세포내 침입억제 작용의 가능성이 있다.

이상의 결과로 보아茵陳淸肝湯은 간염 바이러스와 이에 대한 면역계의 반응으로 인해 간세포 상해가 심한 경우 유용한 것으로 생각되며, 향후 면역 밸런스 조절기능에 관해서는 임상연구 등을 포함하여 지속적인 연구가 이루어져야 될 것으로 사료된다.

결론

茵陳淸肝湯이 HCV 감염 및 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 인간 임파구계 세포인 Molt4 세포에의 HCV 흡착억제작용 및 BALB/c 마우스의 비장세포, PBMC의 IFN- γ , IL-4, IL-10 및 IL-12 분비변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1.茵陳淸肝湯은 $10^2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $10^1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도에서 HCV의 Molt4 세포로의 흡착을 농도의존적으로 억제하였다.
2. IFN- γ 의 분비에 있어서茵陳淸肝湯 $10^1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 24, 48시간 처리군에서 비장세포의 IFN- γ 분비가 유의성 있게 감소하였다.
3. IL-4의 분비에 있어서茵陳淸肝湯 10^2 , $10^1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 48시간 처리군에서 비장세포의 IL-4의 분비가 농도의존적으로 유의성있게 증가하였으며, 말초단핵구의 IL-4 분비농도 $10^2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 48시간 처리군에서 유의성있게 증가하였다.
4. IL-10의 분비는茵陳淸肝湯에 의해 유의성있는 변화를 보이지 않았다.
5. IL-12의 분비에 있어서茵陳淸肝湯 $10^1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 48

시간 처리군에서 비장세포의 IL-12의 분비가 유의성 있게 증가하였으며, 말초단핵구의 IL-12의 분비도 유의성 있게 증가하였다.

이상에서 茵陳淸肝湯은 C형간염바이러스의 감염에 대한 억제작용과 면역계 조절을 통한 간세포보호 작용이 있어, 임상에서 C형 간염에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 熊田博光. 인터페론 治療抵抗性 C型 慢性肝炎의 對策. *Current Therapy*. 1998;16(11):123-127.
2. 小原慕子, 小原道法. C型肝炎 바이러스와 肝發癌. *Current Therapy*. 1998;16(11):70-75.
3. Stevens AB, Coyle PV. Hepatitis C virus. *Occup Med* 2000;50(6):377-382.
4. Rooney G, Gilson RJ. Sexual transmission of hepatitis C virus infection. *Sex Transm Infect*. 1988;74:399-404.
5. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel Statement: Management of Hepatitis C, *Hepatology* 26(suppl 1): 2S-10S,1997.
6. 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.
7. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1981:66.
8. 張仲景. 仲景全書. 서울:高文社. 1984:225,408-411.
9. 金眞珠. 茵陳淸肝湯이 MHV-2로 유발된 마우스의 損傷肝에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1996.
10. 禹弘楨. 慢性B型肝炎에 대한 茵陳淸肝湯의 效果. 제 2회 韓中學術大會論文集. 大韓韓醫師協會. 1995;18-53.
11. 金英哲. 茵陳淸肝湯의 安全性에 대한 研究. 慶熙大學校大學院. 1996.
12. 姜京太. 茵陳淸肝湯加味方이 實驗의 흰쥐의 肝硬變症에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1997.
13. 박용진. 茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1998.
14. 禹弘楨, 李長勳, 金善珉. 茵陳淸肝湯이 HepG 2.2.15 Cell의 HbeAg 發顯抑制에 미치는 效果. 慶熙韓醫大論文集. 1998;21(1):171-179.

15. 姜우성, 金英哲, 李長勳, 禹弘楨. HCV 환자에서 茵陳淸肝湯加味方 投與後 Anti-HCV역가의 變化 觀察 15例, 全國 韓醫學 學術大會. 1998;85,86.
16. 古屋實, 丁宗鐵. C型간염바이러스의 임파구계세포에의 감염에 대한 인삼양영탕의 영향(第1報). *和漢醫藥學會雜*. 1995;12:464-465.
17. 古屋實, 小林嵩雄, 飯島廣治, 丁宗鐵. C型간염바이러스의 임파구계세포에의 감염에 대한 인삼양영탕의 영향(第2報). *和漢醫藥學會雜*. 1996;13:318-319.
18. 古屋實, 飯島廣治, 丁宗鐵. 한방약에 의한 C型간염바이러스의 임파구계세포에의 흡착억제. *일본동양의학잡지*. 1995;45:189.
19. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, *Analytical Biochemistry*. 1987;162:156-159.
20. 松浦善治, 石井孝可, 鈴木哲郎, 宮村達男. C型肝炎 바이러스 백신 開發. *Current Therapy*. 1998;16(11):129-133.
21. Cheney CP, Chopra S, Graham C. Hepatitis C, *Infect Dis Clin North Am*. 2000;14(3):633-667.
22. Shimoyama R, Kato T, Ikada H, Sekiguchi S. Follow-up to HBV and HCV Carriers in a Blood Center. *Vox Sang*. 1998;75:257-258.
23. Masao H. Degree of Diversity of Hepatitis C Virus Quasispecies and Progression of Liver Disease. *Hepatology*. 1994;20:1144-1151.
24. Nousbaum JB. Genomic subtypes of hepatitis C virus: epidemiology, diagnosis and clinical consequences, *Bull Soc Pathol Exot*. 1998;91(1):29-33.
25. 유권. C型 만성 간질환 환자에서 혈청 ALT치와 혈청 C型 간염 바이러스 개체수와의 관계. 대한 내과 학회지. 1995;49(4):507-516.
26. Papatheodoridis GV, Delladetsima JK, Katsoulidou A, Sypsa V, Albrecht M, Michel G, Hatzakis A, Tassopoulos NC. Significance of IgM anti-HCV core level in chronic hepatitis C. *J Hepatology*. 1997;27:36-41.
27. Fredericks SN, Cathy T, Michael WF. Preclinical Evaluation of AMPLICOR Hepatitis C Virus Test for Detection of Hepatitis C Virus RNA, *Jo. Clinical Microbiology*. 1995;1775-1778.
28. 丁宗鐵, 小泉久仁, 花輪壽爾. C型만성간염에 대한 인

- 삼양영당의 효과. 和漢醫藥學會雜誌. 1994;11:428-429.
29. 권소영. Therapeutic Efficacy of Interferon- in Patients with Chronic Hepatitis C-change in Serum HCV-RNA & Anti-HCV. 大韓內科學會誌. 1996;51:168-177.
 30. NIH. the need for additional studies on interferon and new or alternative treatment. Consensus Conference on the management of Hepatitis C. 1997.
 31. Julio M, Sonia N, Mario F, Miguel R, Margarita P, Juan AQ, Friederike Z, Vicente C. In vitro effect of amantadine and interferon -2a on hepatitis C virus markers in cultured peripheral blood mononuclear cells from hepatitis C virus-infected patients. Antiviral Research. 1999;42:59-70.
 32. Cribier B, Schmitt C, Kim A, Stoll KF. Infection of hepatitis C virus adsorption to peripheral blood mononuclear cells by dextran sulfate. Archives of Virology. 1998;143:375-379.
 33. Garson JA, Lubach D, Passa J, Whitby K, Grant PR. Suramin Blocks Hepatitis C Binding to Human Hepatoma Cells In Vitro. Jo. Medical Virology. 1999;57:238-242.
 34. Katayama T, Kikuchi S, Tanaka Y, Saito I, Miyamura T, Choo QL, Houghton M, Kuo G. Blood screening for non-A, non-B hepatitis by hepatitis C virus antibody assay. Transfusion. 1990;30(4):374-376.
 35. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C Virus: Detection of Intracellular Virus Particles by Electron Microscopy. Hepatology. 1996;23:205-209.
 36. Zibert A, Schreier E, Roggendorf M. Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. Virology. 1995;208(2):653-661.
 37. 梁京賢. 劇症性肝炎과 Fas 抗原. Minophagen Medical Review. 1996;41(3):35.
 38. Corado J, Toro F, Riyera H, Bianco NE, Deibis L, De Sanctis JB. Impairment of natural killer cytotoxic activity in hepatitis C virus infection. Clin Exp Immunol. 1997;109:451-457.
 39. Chantal F. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. Jo. General Virology. 1998;79: 2367-2374.
 40. Ohtake N, Suzuki R, Daikuhara H, Nakai Y, Yamamoto M, Amagaya S, Ishige A, Sasaki H, Komatsu Y, Fukuda K, Hayashi S. Modulation of Lung local immune responses by oral administration of a herbal medicine Sho-saiko-to. Int J Immunopharmacol. 2000;22:419-430.