

Lipopolysaccharide로 유발된 HepG2 세포의 염증반응에 대한 가감청간탕의 효과에 대한 연구

김성환, 서상호, 홍상훈

동의대학교 한의과대학 간계내과학교실

The effect of Gagamchunggan-tang on lipopolysaccharide-induced expression of NF- κ -B downstream genes in HepG2 cell

Sung-Hwan Kim, Sang-Ho Seo, Sang-Hoon Hong

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Donggeui University

Objective : The aim of this study was to evaluate the efficacy of Gagamchunggan-tang on anti-inflammation reaction with lipopolysaccharide (LPS)-induced HepG2 cell.

Method : We examined the effects of the Gagamchunggan-tang, a traditional drug for liver inflammation, on the process of lipopolysaccharide (LPS)-induced nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) activation in HepG2 cell. SDS-PAGE, Western blotting, Immunofluorescence staining were studied.

Results : Immunoblot analysis showed that the level of nucleic NF- κ Bp65 was rapidly up-regulated and cytosolic inhibitory I- κ B α was down-regulated by LPS challenge. While Gagamchunggan-tang inhibited an increase of NF- κ Bp65 and degradation of I- κ B α in HepG2 cell. Besides LPS-induced expression of a group of genes, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), are repressed by Gagamchunggan-tang. It may be concluded that Gagamchunggan-tang attenuates the progress of LPS-induced inflammation by reduction of NF- κ Bp65 activation. **Conclusion :** The Gagamchunggan-tang would be useful as a therapeutic agent for endotoxin-induced liver disease.

Key Words: Gagamchunggan-tang, LPS, NF- κ Bp65

1. 緒 論

2000년 통계청 자료를 보면 국내 사망 원인 중 간 질환으로 인한 경우가 40대 남자에 1위, 50대 남자에서 간질환과 간암이 1위와 2위를 차지하고 있다. 이것은 국내에 만성간질환이 광범위하게 퍼져 있음을

말해준다.

한의학에서도 內經 이래로 다양한 치료방법들이 발전하면서 임상에서 활용되어 왔고, 최근에 와서는 현대적인 방법을 응용한 연구가 활발히 이루어지고 있으나 아직 그 결과는 많이 미흡하다.

현재의 국내 연구를 살펴보면, 淸肝湯을 중심으로 이루어지고 있다. 김은 茵陳淸肝湯으로 전격성간염을 일으킨 마우스의 생존율을 53%로 높이는 효과가 있다고 보고하였고, 우는 茵陳淸肝湯이 만성B형간염 환자의 혈청학적 검사상 AST, ALT 등의 간기능

· 접수 : 2003년 1월 8일 · 채택 : 2003년 2월 7일
· 교신저자 : 홍상훈, 부산광역시 부산진구 양정2동 산45-1 동의대학교 부속 한방병원 내과
(Tel : 051-850-8810, Fax : 051-867-5162, E-mail : shhong@demc.or.kr)

개선과 HBeAg의 陰轉에 대한 효과가 있다고 보고하였다. 박⁶은 茵陳清肝湯加味方이 Bcl-2, Bcl-XL 활성을 높여 세포사멸을 억제한다고 보고하였고, 홍⁶은 茵陳清肝湯加味方이 간세포를 보호하고 Cpp32 protease, Fas를 억제하고, Bcl-2를 활성화시켜 세포사멸을 억제한다고 보고하였다. 손⁷은 加味清肝湯으로 간세포 보호효과 및 면역조절효과를 보고하였고, 조⁸는 加味清肝湯으로 57명의 만성 肝疾患患者를 대상으로 임상실험한 결과 50%의 환자에서 AST, ALT의 저하가 나타났고, HBeAg 소실률은 42.9% 였다.

이에 저자는 서양 의학적으로도 그 치료법이 미흡한 바이러스성 간 질환자 및 기타의 肝疾患患者에게 응용될 수 있는 한약 제재의 개발을 위하여 清肝湯을 기본으로 加減清肝湯을 구성하였다. 간암세포주인 HepG2 세포에 LPS에 의한 염증 반응을 일으켜서 加減清肝湯의 항염증효과를 실험적으로 검증하였다.

본 연구에서는 인간 간암세포주인 HepG2 세포에 LPS에 의한 염증반응을 유발시켜, NF-κBp65의 nuclear translocation 억제 효과, inhibitory subunit인 I-κBα degradation 억제 효과 및 NF-κB downstream gene products의 생성에 대한 효과를 관찰한 결과 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

본 실험에 사용한 약재는 한약 규격집에 근거하여 소문약업사(경상북도 영천군 소재)에서 엄선 구입한 것을 사용하였으며, 처방 1첩의 구성내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

2. 시약의 구입과 준비

LPS (from *Escherichia coli* Serotype 055:B5)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였으며, 10 mg/ml의 농도로 deionized distilled water (DDW)에 녹인 다음 1회 사용량 만큼 분주하여 냉동보관하였다. Western blotting에 사용한 anti-NFκBp65, anti-IκBα, anti-TNF-α, anti-COX-2, anti-iNOS는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하여 0.2 ~ 0.5 μg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. 이 밖의 모든 시약은 Sigma-Aldrich 에서 구입하였다.

3. Gagamchunggan-tang 수용액 제조

Gagamchunggan-tang 에 들어간 한약재 1첩을 1,000 ml의 물에 넣어 1시간동안 끓여 수용액을 추출한 다음, 185 mm filter paper (ADVANTEC TOYO No. 2, Japan)를 사용하여 두 번 여과하고, 여과액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 동력건조시켰다. 건조된 시료를 곱게 마쇄하여 -20

Table 1. Prescription of Gagamchunggan-tang

韓藥名	Herbal Name	Scientific name	Dose
丹蔘	Salviae miltiorrhizae Radix	Salvia miltiorrhiza Bunge	20g
茵陳	Artemisiae capillaris Herba	Artemisia capollaris Thunb	20g
白朮	Atractylodis macrocephalae Rhizoma	Atractylodes macrocephala Koidz	8g
白芍藥	Paeoniae radix Alba	Paeonia lactiflora Pall	8g
葛根	Puerariae Radix	Puerarialobata(willd.)Ohwi	8g
白茯苓	Poria	Poria cocos Wolf	8g
山楂	Crataegii fructus	Crataegus pinnatifida Bunge	8g
甘草	Glycyrrhizae radix	Glycyrrhiza uralensis Fisch	6g
鬱金	Curcumae radix	Curcuma aromatica Salisb	6g
白花蛇雪草	Oldenlandiae diffusae herba	Oldenlandia diffusa (Willd) Roxb	6g
當歸	Angelicae gigantis radix	Angelica gigas Nakai	6g
葛花	Flos puerariae	Puerarialobata(willd.)Ohwi	6g
Total			10g

℃에 보관하였으며, 실험에 사용하기 직전 10 mg/ml의 농도로 세포 성장 배지에 녹여 0.2 μ m의 syringe filter로 다시 여과하여 500 μ g/ml의 농도로 처리하였다.

4. 세포주의 배양 및 처리

인간 간암세포주인 HepG2 세포와 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다. HepG2 세포는 Minimum essential medium (MEM, GIBCO BRL, Grand Island, NY)에 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), 1% penicillin-streptomycin (GIBCO BRL)을 첨가한 성장배지를 사용하였다. 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GIBCO BRL)에 10% FBS를 첨가한 성장배지로 배양하였다. 두 세포주 모두 5%의 CO₂ 농도가 유지되는 humidity incubator에서 37 ℃의 온도로 배양하였다. SDS-PAGE 및 Western blotting을 위해 HepG2 세포에 trypsin-EDTA (GIBCO BRL)를 처리하여 culture plate로부터 detach시킨 다음, 100 mm의 culture plate에 seeding하고 48 hr 동안 안정화시켰다. 500 μ g/ml의 농도로 동결건조한 약재를 처리하고 2 hr 후, 10 μ g/ml의 LPS를 처리하고 1, 6 hr 후, 배양세포를 harvest하였다.

5. Nuclear extract와 cytosolic extract의 분리

배양세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻은 후, buffer A(10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)로 15 min 동안 ice 상에서 incubation하고 final concentration이 0.5%가 되도록 NP-40을 처리하고 강하게 vortexing하였다. 30 sec 동안 5,000 rpm에서 원심분리하여 상층액은 cytosolic extract로 취하고, pellet은 buffer B (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)에 녹여 15 min 동안 ice상에서 incubation하고, 13,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리하여 상층액을 nuclear extract로 취하였다.

6. SDS-PAGE 및 Western blotting

배양세포를 PBS로 씻은 후, lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% SDS, 0.5% Triton X-100, 1 μ M PMSF, 50 mM NaF, 50 mM Tris pH 7.4)로 lysis시켜 14,000 rpm에서 20 min 간 원심분리하여 whole cell protein extract를 얻었다. whole extract 및 nuclear extract, cytosolic extract를 Biorad의 protein assay kit (Hercules, CA)를 이용하여 protein을 정량한 후, 동량의 Laemmli's sample buffer를 가하여 100 ℃에서 3 분간 가열한 다음, 10% SDS gel에 loading하여 전기영동하였다. 전기영동 후 gel상의 protein을 nitro-cellulose membrane으로 transfer하여 5% skim milk로 비특이적인 항원의 반응을 blocking하고, anti-NF κ Bp65, anti-I κ B α , anti-TNF- α , anti-COX-2, anti-iNOS와 이에 대한 secondary antibody (HRP-conjugated goat anti-rabbit)를 처리하였다. PIERCE의 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Rockford, IL)를 membrane에 가하여 X-ray film에 감광시켰다.

7. Immunofluorescence staining

RAW264.7 세포를 cell scraper로 긁어모은 다음, coverslip 위에 seeding하고 24 hr 동안 안정화시켰다. 500 μ g/ml의 동결건조한 약재를 처리하고, 2시간 후 10 μ g/ml의 LPS를 처리하였다. 1 hr 후 배지를 제거하고 PBS에 3.7% 농도로 희석시킨 formaldehyde로 30 min 간 4℃에서 고정하였다. 0.2% Triton X-100으로 permeabilization하고, 2% bovine serum albumin (BSA)로 비특이적인 항원의 결합을 억제시킨 후, 2 μ g/ml의 anti-NF- κ Bp65 항체를 처리하여 4 hr 동안 항원-항체반응을 일으킨 다음, PBS-T (0.05% Tween-20 in PBS)로 씻어내고, FITC-conjugated goat anti-rabbit (SIGMA-ALDRICH) 항체를 4 ℃ 암상태에서 1 hr 동안 처리하였다. PBS-T로 씻어낸 후, 세포핵의 위치를 판별하기 위한 염색으로 1 μ g/ml의 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)를 2 min 간 처리하여 DDW에 씻어낸 다음 Crystal mount (Biomed, Foster, CA)로 slideglass에 mounting하였다. NF- κ Bp65의 세포내 localization은 488 nm의 excitation

wave length를 내는 UV filter로 관찰하였으며, 동일한 field에 위치하는 세포핵은 359 nm의 xcitation wave length를 내는 UV filter로 관찰하였다. 관찰과 사진촬영은 Axioskop 2 plus fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany)와 AxioCam digital camera (Carl Zeiss), AxioVision software (Carl Zeiss)를 이용하였다.

III. 研究結果

1. Gagamchunggan-tang의 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation 억제 효과

인체 간암세포인 HepG2 세포에서 LPS에 의한 염증반응을 조사하기 위해 LPS 처리 2 hr 전에 Gagamchunggan-tang을 전처리하고, LPS를 처리한 다음, 1, 6 hr 후 세포를 harvest하여 10% SDS-PAGE로 전기영동하였다. Fig. 1.의 A는 whole cell extract를 전기영동한 gel을 Coomassie blue staining을 실시한 것이며, 그 결과 total protein band의 차이점을 보이지 않았다. 그러나 Fig. 1. B와 C에서 보는 바와 같이 NF- κ Bp65의 세포내 localization에서는 차이가 남을 알 수 있었다. Fig. 1. B가 보여주는 바와 같이 nuclear extract의 NF- κ Bp65는 정상상태에서는 잘 보이지 않으나 LPS를 처리하면 band가 진하게 나타났으며, 이러한 현상은 Gagamchunggan-tang의 전처리에 의해 부분적으로 억제되고 있음을 보여준다. 그 반면에 cytosolic NF- κ Bp65는 LPS 처리에 의해 감소되지만 역시 이러한 감소 역시 Gagamchunggan-tang의 전처리에 의해 억제(Fig. 1. C)되는 것으로 보이므로, Fig. 1. B의 결과를 뒷받침한다.

또한 이러한 현상의 확인을 위하여 anti-NF- κ Bp65 항체를 이용한 immunofluorescence staining을 실시하였다. RAW264.7 마우스 대식세포에 앞서와 동일한 조건에서 실험한 후 anti-NF- κ Bp65 항체와 FITC-conjugated goat anti-rabbit 항체를 차례로 처리하고 형광현미경으로 관찰하였다. Fig. 2. A와 B에서 보여주는 것과 같이 정상상태의 세포와 Gagamchunggan-tang을 각각 처리한 세포에서는 세포핵이 아닌 세포질에 NF- κ Bp65가 존재하는 것으로 나타났다. 그러나

LPS를 처리한 경우 세포핵이 위치한 곳에 집중적으로 NF- κ Bp65가 위치하고 있음을 알 수 있다 (Fig. 2. C). Fig. 1. B, C와 마찬가지로 이러한 현상은 Gagamchunggan-tang을 전처리한 세포에서는 억제되고 있음을 Fig. 2. D는 보여주고 있다. 이러한 결과들로 보아 Gagamchunggan-tang은 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation에 대해 억제효과를 가지는 것으로 생각된다.

2. Gagamchunggan-tang의 LPS에 의한 I- κ B α degradation 억제 효과

Fig. 1, 2에서 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation이 Gagamchunggan-tang에 의해 억제되는 것으로 나타났으므로 이에 중요한 요인으로 작용

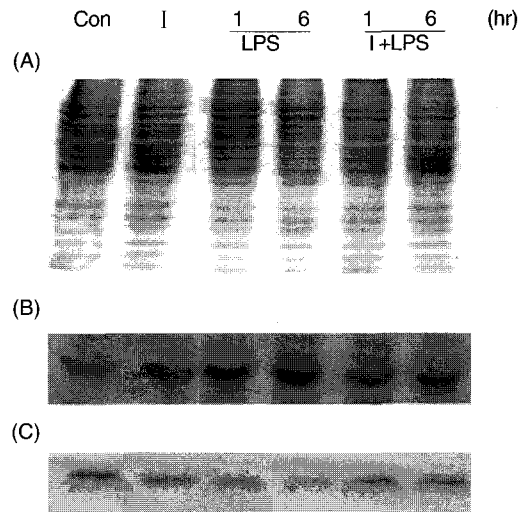


Fig. 1. Inhibitory effects of Gagamchunggan-tang on the nuclear translocation of NF- κ Bp65 (A), Coomassie blue staining with HepG2 cell whole extract-subjected 10% polyacrylamide gel. (B:nuclear NF- κ Bp65) and (C:cytosolic NF- κ Bp65), inhibition of LPS-induced NF- κ Bp65 nuclear translocation by Gagamchunggan-tang. Cells were pretreated with 500 μ g/ml of Gagamchunggan-tang before LPS challenge (10 μ g/ml), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. 40 μ g of cytosolic and nuclear extract were examined by Western blotting with anti-NF- κ Bp65 antibody.(1 :Gagamchunggan-tang)

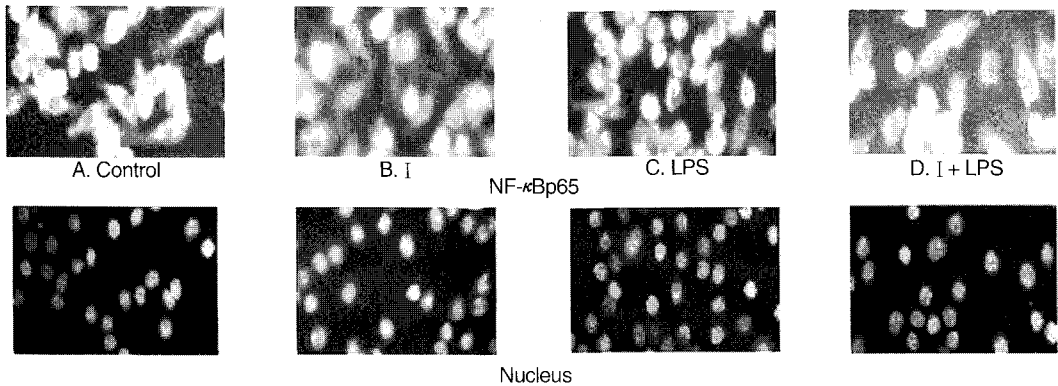


Fig. 2 Effects of Gagamchunggan-tang on localization of NF- κ Bp65 in RAW264.7 cells (A), Normal. (B) Gagamchunggan-tang alone. (C), LPS alone. (D), treatments of Gagamchunggan-tang before LPS challenge. Cells were pretreated with 500 μ g/ml of Gagamchunggan-tang before LPS challenge (10 μ g/ml), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. Fixed cells were stained with anti-NF- κ Bp65 rabbit polyclonal antibody and FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody. (I :Gagamchunggan-tang)

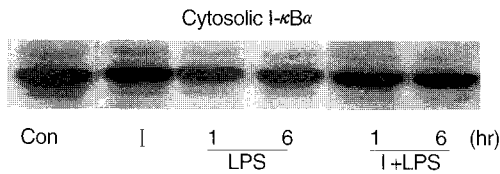


Fig. 3. Inhibition of I- κ B α degradation by Gagamchunggan-tang HepG2 cells were pretreated with 500 μ g/ml of Gagamchunggan-tang before LPS challenge (10 μ g/ml), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. 40 μ g of cytosolic extract were examined by Western blotting with anti-I- κ B α antibody. (I :Gagamchunggan-tang)

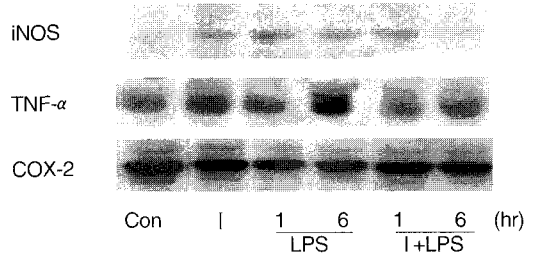


Fig. 4. Inhibitory effect of Gagamchunggan-tang on LPS-induced iNOS, TNF- α and COX-2 expression HepG2 cells were pretreated with 500 μ g/ml of Gagamchunggan-tang before LPS challenge (10 μ g/ml), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. 40 μ g of whole extract were examined by Western blotting with anti-iNOS antibody, anti-TNF- α antibody and anti-COX-2 antibody. (I :Gagamchunggan-tang)

하는 I- κ B α 의 protein level을 HepG2 세포에서 조사하였다. 그 결과 Fig. 3.에서 보는 것과 같이 정상상태에서는 많은 양의 I- κ B α 가 cytosol에서 관찰되었으나, LPS가 처리되면 그 양이 상당히 줄어드는 것으로 나타났다. 그러나 이 또한 Gagamchunggan-tang의 전처리에 의해 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 LPS에 의해 유발되는 염증반응에서 중요한 역할을 수행하는 NF- κ Bp65의 활성화가 Gagamchunggan-tang에 의해 억제될 수 있음을 알 수 있었다.

3. NF- κ B downstream gene products의 생성에 대한 Gagamchunggan-tang효과

위의 결과들을 확인하기 위해 이미 알려져 있는 NF- κ B downstream gene products의 level을 Western blotting으로 조사하였다. 그에 따라 염증기전의 신호 전달 및 면역작용에서 기능을 수행하는 NO를 합성하는 효소인 iNOS의 level을 먼저 조사하였다. 정상 상태에서는 잘 보이지 않는 iNOS가 LPS를 처리하면 발현이 일어나며, 이러한 결과는 Gagamchunggan-

tang의 전처리에 의해 억제되어진다. 또한 이차적인 염증반응을 일으키는 TNF- α 및 COX-2 역시 동일한 결과를 보여주고 있다 (Fig. 4).

IV. 考 察

간염을 포함한 간질환의 치료로 현재까지 알려진 서양의학적인 치료법에는 항바이러스제, 면역조절제, 그리고 간기능을 도와주는 보조적인 치료 등이 있으나 간염 자체의 진행을 막는 만족스런 치료방법은 제시되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 새로운 치료 약제 및 방법을 찾고자 하는 연구가 지속되고 있다.⁹

간질환 치료제에 대한 최근에 한의학계의 연구들은 淸肝湯을 중심으로 이루어지고 있다. 연구에 사용된 치료 처방을 살펴보면, 강¹⁰은 茵陳, 地榆(炒黑), 白朮, 猪苓, 白茯苓, 覆盆子, 澤瀉, 蘿藦子, 青皮, 三稜, 蓬朮, 砂仁, 甘草, 生薑 으로 茵陳淸肝湯加味方을 구성하여 collagen type IV의 발현 및 간조직의 섬유화를 억제하는 효과를 보고하였고, 김¹¹은 茵陳, 地榆, 白朮, 白茯苓, 猪苓, 覆盆子, 澤瀉, 蘿藦子, 青皮, 甘草로 茵陳淸肝湯을 구성하여 C형 간염바이러스의 감염에 대한 억제작용과 면역계 조절을 통한 간세포보호작용이 있음을 보고하였고, 이¹²는 茵陳, 葛根, 赤楊, 陳皮, 白朮, 澤瀉, 白茯苓, 厚朴, 砂仁, 草豆蔻, 甘草로 淸肝解酒湯을 구성하여 알코올성 지방간에 유의한 치료효과가 있음을 보고하였다.

이에 저자는 그 동안 간장 질환 치료에 유의성이 있다고 실험 등을 통해 알려진 丹蔘, 茵陳, 白朮, 白芍藥, 葛根, 白茯苓, 山查, 甘草, 鬱金, 白花蛇雪草, 當歸, 葛花로 加減 淸肝湯을 구성하여 간질환에 대한 효과를 검증하고자 하였다.

丹蔘은 活血祛瘀凉血安神的 효능있는 것으로 알려져 있으며 최근 중국에서 만성간염 및 간경변증에 많이 이용하는 약물로 만성B형 간염에서 간기능 개선, 치료에 효과가 있고 간경변증에서 증상 호전과 간섬유화 진행억제 등에 유의한 효과가 있다고 보고되고 있다.¹³ 茵陳은 국화과에 속한 다년생 초본으로 사철썩이라고도 하며 溼濕利水, 淸濕熱作用이 있어

黃疸 등 濕熱熏蒸型 肝疾患에 다용되고 있다. 이¹⁴는 茵陳에 rat의 CCl₄처리 간장해에 의해 S-GOT, S-GPT, S-ALT 의 혈중증가를 유의성 있게 보호하는 활성이 있음을 보고하였고, 최¹⁵등은 茵陳이 에탄올에 의해 증가되는 TNF- α 와 IL-1 α 의 생성을 억제시킴으로써, 에탄올 의한 간세포의 독성작용을 억제하여 간세포를 보호하는 작용이 있음을 보고하였고 김¹⁶등은 茵陳蒿 추출물이 Fas-FasL 상호작용을 매개로 한 apoptosis로 인한 간기능장애, 급성 간염, 만성 간염 등의 질환에서 간기능을 보호하는 활성이 있음을 보고하였다. 白朮은 간변성괴사정도를 감소시키며, SGPT, SGOT, SDH를 하강시키며 손상된 간조직의 회복을 촉진시켜 간보호작용이 뚜렷한 약물이다.¹⁷ 白芍藥은 형태학상의 간세포변성과 괴사를 개선시키고 회복시키며 간세포재생효과가 뛰어나다.¹⁷ 葛根은 우¹⁸등이 葛根이 사용된 처방을 응용하여, 葛根이 알코올로 인해 손상된 간세포를 회복시키는데 효과가 있음을 보고하였다. 葛花는 酒傷의 代表方인 葛花解醒湯의 主藥으로 우¹⁸는 에탄올 중독 흰쥐의 간기능 회복에 葛花가 효과가 있음을 보고하였다. 박¹⁹등은 葛花의 ADH 저해효과와 ALDH 저해효과가 비슷했으나 오히려 ALDH 저해효과가 더 낮아 acetaldehyde의 분해를 억제하는 것으로 나타났다고 보고하였다. 柴胡는 한²⁰이 柴胡水鍼이 혈청중 LDH, ALP, γ -GTP의 활성을 감소시키는 효능이 있음을 보고하였으며, 강²¹은 AAP로 유도된 급성 간독성에 회복 효과를 보고한 바 있다. 山查는 관상동맥의 혈류량을 증가시키고, 혈중 지질을 강하시키며 담즙분비를 촉진한다.^{17,22} 白花蛇雪草는 淸熱利濕, 解毒, 消癰의 효능과 항종양, 항균 및 소염의 약리 작용을 나타낸다고 알려져 있고 관련된 실험적 연구로 간장을 보호하는 효과가 있다고 알려져 있다.^{23,24} 鬱金은 ALT저하, 간세포 재생 및 간장의 단백질 합성을 증가시킨다.²⁵ 甘草는 간세포의 괴사작용을 현저하게 억제하여 간세포 보호작용이 있으며 담즙분비 촉진 및 간세포내 RNA 함량을 증가시켜 간세포 재생을 촉진한다.¹⁷ 當歸는 補血和血의 효능이 우수하다고 알려져 있는데 간독성 물질로부터의 간세포 손상을 보호하는 작용이 있다.

또한 음주 후 혈중에 남아있는 알코올 및 알데히드를 효과적으로 제거하는 효과가 있다.²⁶ 白茯苓은 면역 작용을 조절하여 항종양효과 및 임파세포를 자극하여 인터페론 생성을 촉진시킨다.²⁵

이상의 약물의 약리에 의하면 Gagamchunggan-tang은 바이러스성, 알코올성, 영양대사성 간질환 환자에서 지질대사에 관여하고 ALT를 저하시켜 간세포 보호 및 재생 효과가 있을 것으로 추론하고 실험에 임하였다.

염증반응은 필수적인 숙주방어체계로 radiation, 그람 음성 세균의 산물인 LPS, TNF- α , interleukin-1 (IL-1)과 같은 사이토카인, ceramide, H₂O₂ (hydrogen peroxide), phorbol ester (PMA), hyperoxia/hypoxia, 여러 화학요법 약물 등의 광범위한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다.²⁷ 세포가 염증 유발 물질에 노출되면 세포막 연접에 관여하는 단백질과 cyclooxygenases, lipoygenases 등과 같은 arachidonic acid 대사과정의 중요 효소, 그리고 염증성 사이토카인과 그 수용체, MHC (major histocompatibility complex) 및 metalloproteases 등을 암호화하고 있는 유전자들이 활성화된다.²⁸ 이들 유전자의 대부분은 프로모터 영역에 NF- κ B가 결합할 수 있는 자리가 존재하며, NF- κ B의 활성화는 앞서 언급한 거의 모든 염증 유발 물질에 의해 유도되어진다.²⁹ 정상적인 환경에서 NF- κ B는 모든 유허세포의 세포질에서 p50/p65 subunits의 heterodimer로 존재하고 있으며, inhibitory subunit 인 I- κ B와 결합하고 있다. 염증성 자극이 주어지면 수분 내에 I- κ B 인산화효소 (IKK)의 활성화가 유도되고, 활성화된 IKK는 I- κ B의 인산화를 일으켜 세포내 단백질 분해기전의 하나인 ubiquitin-mediated protein degradation을 유발한다. I- κ B로부터 자유로워진 NF- κ B는 세포핵 속으로 이동하고, NF- κ B 결합영역이 있는 염증 유전자의 프로모터에 결합하여 그 유전자의 전사를 일으킨다.³⁰ NF- κ B에 의해 활성화되는 대표적인 염증 유전자는 iNOS, COX-2, TNF- α 등이며, 이들은 이차적인 염증반응을 세포내에서 일으키는 것으로 알려져 있다.³¹

iNOS는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS

(eNOS) 등과 더불어 nitric oxide synthase (NOS) family의 한 종류이며, 두 가지 다른 종류의 NOS와는 달리 세포내에서 많은 양이 발현되어 있지는 않으며, 염증성 자극이 주어질 때 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. NOS는 L-arginine, O₂, NADPH-derived electron으로부터 L-citrulline, NADP, 그리고 nitric oxide (NO)를 생성시킨다.³² NO는 생체내 면역 체계에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 또는 활성산소종간매개물 (reactive oxygen intermediates, ROI)로 작용하여 박테리아 등에 감염된 세포가 자체 방어기전을 나타낼 때 생성되는 물질이다. 최근에는 NO가 면역체계에서의 역할뿐만 아니라 세포내 신호전달물질로서의 기능, 심혈관 및 뇌혈관의 확장등과 같은 혈관협착치료제로서의 기능을 한다는 것이 밝혀져 있다.³³

COX-2는 앞서 언급한대로 아라키돈산 대사 작용에서 중요한 역할을 수행하는 효소로서 역시 염증성 자극 등에 의해 유도된다. 아라키돈산은 세포내 원시 발암 유전자로 알려진 Ras 단백질의 불활성화에 관계하는 Ras-GAP (Ras GTPase-activating protein)을 억제하며, 혈소판에 의해 NO의 합성이 촉진되도록 하는 기능을 가지는 물질이다.³⁴ 아라키돈산은 세포막의 인지질로부터 phospholipase A2 (PLA2)의 작용에 의해 생성되며, COX, lipoygenase 등에 의해 prostaglandin, leukotrien 등과 같은 물질로 전환된다.³⁵ COX에 의해 생성되는 prostaglandin은 많은 유도체를 가지고 있으며, 그 중 COX-2에 의해 생성되는 prostaglandin E2 (PGE2)는 세포의 성장과 분열에 중요한 역할을 수행하는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade를 억제하는 것으로 알려져 있다.³⁶

TNF- α 는 암세포를 사멸 시키는 프로그램인 apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 대표적인 물질로 세포내 단백질 분해기구의 또 다른 축인 caspases cascade를 활성화시켜 apoptosis를 유도한다.³⁷ 그러나 최근 TNF- α 가 세포 증식 및 생존에 관여하는 신호전달경로의 활성화에도 관여하는 것으로 알려져 있어³⁸ 염증성 자극에 의해 생성되는 TNF- α 는 후자의 경로

를 이용할 것으로 추측된다.

LPS에 의한 NF-κB의 활성화는 주로 세포막에 위치한 LPS 수용체인 CD14와 Toll-like receptor 2/4와 그 하위 신호전달분자에 의해 일어나며, 그 최종적인 목표는 IKK이다. IKK는 α, β, γ의 세 가지 subunit으로 구성된 trimer로 구성되어있으며, activating signal에 의해 활성화되면 NF-κB에 결합하고 있는 I-κBα를 인산화시켜 NF-κB로부터 분리되도록 한다.³⁹

Fig. 1, 2에서 나타난 결과들은 LPS에 의한 NF-κB로부터 I-κBα 분리현상이 Gagamchunggan-tang에 의해 억제되는 것으로 추측할 수 있다. 또한 이러한 분리에 중요한 역할을 수행하는 IKK의 활성화 역시 억제될 것으로 추측할 수 있으나 IKK activity assay를 통한 직접적인 결과들이 제시되어야 할 것으로 생각된다. 만약 IKK activity가 Gagamchunggan-tang의 전처리에 의해서도 억제되어지지 않는다면, Fig.3은 I-κBα의 degradation pathway인 ubiquitin-mediated protease pathway에 Gagamchunggan-tang이 관여할 수 있음을 나타내는 간접적인 결과이나 이 또한 철저한 검증이 필요하다.

Gagamchunggan-tang의 전처리에 의해 LPS에 의한 NF-κBp65의 활성화가 억제되므로 그 downstream gene products인 TNF-α, COX-2 및 iNOS의 발현이 완전히 또는 부분적으로 억제됨은 당연할 수도 있다. 그러나 그들 gene의 프로모터 영역에는 NF-κB binding site만 존재하는 것이 아니라 여러 가지 다른 전사인자들도 결합할 수 있으므로⁴⁰⁻⁴² Fig. 4의 결과들은 여러 가지 의미를 가지고 있다. 즉, iNOS gene의 promoter 영역에는 interleukin 등에 의해 활성화되는 전사인자인 signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) 또는 STAT3 역시 결합할 수 있으며, STAT을 활성화시키는 경로는 염증반응의 또 다른 주요한 경로로 인식되어지고 있다. 최근 심근세포주에서의 실험결과에 의하면 LPS는 그 수용체인 CD14 downstream signal pathway, 즉 NF-κBp65 활성화 경로를 이용하지 않을 수 있으며, 그런 경우 STAT1 등을 활성화시키는 경로를 이용한다는 것이다.⁴³

그러므로 Fig. 4의 결과로 추측할 수 있는 것은

Gagamchunggan-tang이 LPS의 downstream signaling 중 NF-κB 및 STAT의 활성화 경로를 차단하여 iNOS의 발현이 억제될 수도 있음을 시사한다. 또한 TNF-α와 COX-2의 경우에도 유사한 iNOS의 발현과 유사하거나 동일한 경로를 가지므로 Fig. 4의 결과 역시 Gagamchunggan-tang의 항염증효과를 보여준다 할 수 있겠다.

가감청간탕이 HepG2 세포에 박테리아에서 추출한 염증 유발물질인 LPS를 처리하여 유발시킨 일련의 염증반응의 억제효과를 확인하였다. 앞으로 실험동물을 통한 간세포보호, 간기능개선 및 임상적인 효과에 대한 지속적인 검증이 요구된다.

V. 結 論

Gagamchunggan-tang이 인체 간암세포주인 HepG2 세포에 박테리아에서 추출한 염증 유발물질인 LPS를 처리하여 유발시킨 일련의 염증반응에 미치는 영향을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Gagamchunggan-tang은 LPS에 의한 NF-κBp65의 nuclear translocation에 대해 억제효과를 가지고 있다.
2. Gagamchunggan-tang은 LPS에 의해 유발되는 염증반응에서 중요한 역할을 수행하는 NF-κB의 활성화를 억제시킨다.
3. Gagamchunggan-tang은 NF-κB downstream gene products인 iNOS, COX-2, TNF-α 등의 발현을 억제시킨다.

參考文獻

1. 통계청. 99년도 사망원인통계결과. 2000:1-40
2. 광경규, 김연진, 조종관. 生肝健脾湯을 이용한 慢性肝炎 35例에 대한 臨床分析. 大田大學 校 韓醫學研究所 論文集. 1997;6:313-8.
3. 김진주. 茵蔯清肝湯이 MHV-2로 유발된 마우스의 損傷肝에 미치는 영향. 慶熙大學校 大醫院. 1996.
4. 우홍정. 만성B형간염에 대한 茵蔯清肝湯의 효과. 제 2회 한중 학술대회참가논문집-간장병- 1995:18-53.

5. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(1):145-64.
6. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 간세포 활성세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 1998;19(2):337-72.
7. 손창규, 한성수, 조종관. 加味清肝湯의 肝保護 및 免疫調節效果. 대한한의학회지. 2002;23(2):28-38.
8. 조정호, 이용연, 서상훈, 유화승, 최우진, 이연월, 손창규, 조종관. 慢性 肝疾患 57例에 대한 臨床報告. 대한한의학회지. 2000;21(4):112-21.
9. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology. APPOLTON & LANGE. Stanford. 1997:538-41.
10. 강경태, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 간조직의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(2):39-56.
11. 김선민, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 C형 간염바이러스의 입파구계 세포감염에 미치는 영향. 2001; 22(1):53-62.
12. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지. 2001;22(4):107-13
13. 趙和平, 王好善, 郭雪萍, 張建說, 李清包, 申紀軒. 重用丹蔘注射液治療乙型肝炎117例. 中國中西醫結合雜誌. 1995;15(10):624
14. 이채중, 김형환, 김종대, 김철호. 茵陳蒿의 열수 및 배탄을, 에테르, 부탄을 추출물이 CCl4 유발에 의한 간독성 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(1):100-7.
15. 최수덕, 심정섭, 김일환, 김강산, 강병기. 茵陳蒿가 Hep G2 세포에서 에탄올 매개성 Cytokine 분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;21(1):87-93.
16. 김선강, 안중환, 김종대, 김철호. 茵陳蒿가 Fas-FasL 매개형 간세포 Apoptosis 에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;23(3):353-60.
17. 方文賢, 宋崇順, 周立孝. 醫用中藥藥理學. 북경 인민위생출판. p361,578,598,682. 1998.
18. 우홍정. 葛花解醒湯이 Ethanol 중독 흰쥐의 간기능에 미치는 영향. 경희대논문집1984;7:87-104.
19. 박형규, 이장훈, 우홍정. 酒傷에 활용되는 數種의 한약물이 알코올대사 및 간장해에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000;21(3):186-98.
20. 한상원. 龍膽草 및 柴胡水鍼이 CCL4로 유발된 흰쥐의 손상간에 미치는 영향. 경산대학교대학원. 1992.
21. 강혜경. Acetaminophen에 유도된 급성 간독성에 미치는 시호의 효과. 덕성여자대학교대학원. 1992.
22. 손창우, 채종구, 김길원, 신흥묵. 山査의 혈관이완 효과와 항산화 작용. 동의생리병리학회지. 2002;16(1):67-71.
23. 김미려. Carbon tetrachlrde 로 유발된 간손상에 미치는 백화사설초와 동충하초의 효과. 동서의학. 1994;19(2):52-9.
24. 김미려. Carbon tetrachlrde 와 백화사설초 및 동충하초의 병용투여가 간장 및 혈청성분에 미치는 영향. 동서의학. 1994;19(3):5-10.
25. 鄭虎占, 董澤宏, 余靖. 中藥現代研究與應用. 北京 學苑出版社. p2795,3126. 1998.
26. 정우상, 송재철, 박정미, 김상우. 당귀추출물 전처치가 Rat의 혈중 알코올 및 알데히드 농도에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(2):174-80.
27. Rastogi D, Ratner AJ, Prince A. Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. Paediatr Respir Rev. 2001 Sep;2(3):245-52.
28. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. Front Biosci. 2002 Sep 1;7:d1899-914.
29. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. Nat Rev Immunol 2002 Oct;2(10):725-34.
30. Baldwin, AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 14: 649-81, 1996
31. Rothwarf DM, Karin M. The NF-κB activation pathway: A paradigm in information transfer from membrane to nucleus. SciSTKE. 1999; 5: RE1.
32. Nathan CF, Xie F. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994; 269: 13725-8.
33. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. Cardiovasc Res. 2002 Aug 1;55(2):250-60.
34. Signorello MG, Pascale R, Leoncini G. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. Eur J Clin Invest. 2002 Apr;32(4):279-84.
35. Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. J Clin Invest. 2001 Jun;107(11):1339-45.
36. Kang SS, Li T, Xu D, Reinach PS, Lu L. Inhibitory effect of PGE2 on EGF-induced MAP kinase activity and rabbit corneal epithelial proliferation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Jul;41(8):2164-9.
37. Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. TNF-alpha

- promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet.* 2002 Apr;19(4):201-4.
38. Gupta S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced aling. *J Clin Immunol.* 2002 Jul;22(4):185-94.
39. Senftleben U, Karin M. The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1 Supp):S18-S26.
40. Udalova IA, Kwiatkowski D. Interaction of AP-1 with a cluster of NF-kappa B binding elements in the human TNF promoter region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 23;289(1):25-33.
41. Punzalan C, Cai C, Schroeder RA, Kuo PC. Redox regulation of the rat hepatocyte iNOS promoter. *Surgery.* 1999 Aug;126(2):450-5.
42. Glinghammar B, Inoue H, Rafter JJ. Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1. *Carcinogenesis.* 2002 May;23(5):839-45.
43. Kovarik P, Stoiber D, Novy M, and Decker T. STAT1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *J. EMBO.* 1998;17: 3660-8.