

清肝解酒湯이 alcohol 대사관련 유전자 및 apoptosis에 미치는 영향

김영태, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effects of Chungganhaeju-tang on Gene Expression of Alcohol-metabolizing Enzymes and Alcohol-induced Apoptosis

Young-Tae Kim, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Dept. of Internal medicine I, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Objectives : This study was designed to investigate the effects of Chungganhaeju-tang on expression of alcohol-metabolizing enzymes, cell viability and alcohol-induced apoptosis.

Materials and Methods : For this study, the human hepatoma cell line HepG2 was used. HepG2 cells were treated with ethanol-or acetaldehyde, chungganhaeju-tang, anti-Fas neutralizing antibody and were investigated by using quantitative RT-PCR, MTT and Trypan blue exclusion assays.

Results : The results are summarized as follows :

1. Quantitative RT-PCR analysis demonstrated that ethanol-or acetaldehyde-mediated increase of ALDH gene expression was not affected by Chungganhaeju-tang treatment.
2. Ethanol-or acetaldehyde-induced apoptosis was remarkably inhibited by Chungganhaeju-tang in a dose-dependent manner.
3. Ethanol- or acetaldehyde-induced apoptosis was significantly blocked by anti-FasL neutralizing antibody, suggesting apoptosis induced by alcohol might be mediated by FasL/Fas signaling pathway.

Conclusions : Taken all together, these results indicate that the FasL/Fas signaling plays a critical role in alcohol-induced apoptosis and Chungganhaeju-tang increases viability of liver cells by suppression of the FasL/Fas-mediated apoptosis-signaling pathway.

Key Words: Chungganhaeju-tang(Qingganjieju-tang), ALDH(aldehyde dehydrogenase), HepG2, Fas, apoptosis

I. 緒 論

최근 우리나라는 급격한 경제성장 및 생활양식의 서구화에 따라 알코올 소비량이 점차 증가하고 있는 추세이다. 이러한 사실은 우리나라의 주된 간질환의 원인으로 알려진 바이러스성 간염이 감소하고 있는 반면 지방간, 알코올성 간염, 알코올성 간경변증 등

· 접수 : 2003년 1월 17일 · 채택 : 2003년 2월 7일
· 교신저자 : 이장훈, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지 경희
의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel: 02-958-9118, Fax: 02-958-9120, E-mail:
komclive@khmc.or.kr)

알코올성 간질환이 매년 증가한다는 보고²⁾와 매우 밀접한 관련이 있다. 생활양식의 서구화에 따른 술에 대한 취향이 저농도에서 고농도 주류로 변해가는 경향과 여성 음주자의 증가 및 음주연령의 연소화, 20대에서 40대까지 음주량의 증가와 함께 특히 폭음하기 쉬운 우리나라의 음주문화는 간질환을 위시한 많은 사회문제를 야기할 것으로 보이며 이에 대한 대책도 시급한 실정이다³⁾.

체내의 알코올 대사는 주로 세가지의 효소 system에 의해 대사되는데, ADH, cytochrome P-450 II E1으로 밝혀진 MEOS 및 catalase에 의한 경우이다. 알코올은 ADH에 의해 acetaldehyde로 전환되고, 다시 ALDH에 의해 acetic acid로 전환되어 체내의 에너지 대사에 이용된다. 이러한 대사과정 중에 생기는 부산물인 acetaldehyde는 체내 알코올 독성의 직접적인 원인이 된다⁴⁾. 따라서 알코올 대사관련 효소 즉, ADH와 ALDH는 알코올성 간질환의 연구에 있어 주요 관심사가 되고 있다.

淸肝解酒湯은 酒傷에 대표적인 처방으로 濕痰을 제거하는 對金飲子에 淸熱利濕하는 茵蔯四苓散을 合方하고 酒毒에 사용되는 葛根, 赤楊 등을 가미하여 구성된 방제이다. 淸肝解酒湯에 대한 연구로 郭⁵⁾은 淸肝解酒湯이 알코올 대사과정에서 acetaldehyde의 생성을 억제하고 알코올에 의해 저하된 간기능을 회복시키는 작용이 있음을 보고하였고, 李⁶⁾는 알코올성 지방간 환자에 있어 淸肝解酒湯 투여후 혈청 AST, ALT, GGT, TG가 통계적으로 유의한 감소가 있음을 보고하였다. 그러나 淸肝解酒湯이 알코올대사 효소의 유전자 발현이나 cytotoxicity 및 apoptosis에 대해 구체적으로 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구는 미미한 실정이다.

이에 저자는 淸肝解酒湯이 알코올 대사관련 유전자 및 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하고자, HepG2 cell을 이용하여 알코올 분해대사에 직접 관여하는 효소의 유전자 발현에 미치는 영향을 quantitative RT-PCR을 이용하여 조사하였고, 또한 alcohol 유도성 cytotoxicity에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 조사하였으며, alcohol 유도성 apoptosis에 미치

는 영향을 Trypan blue exclusion assay로 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 한약규격집⁷⁾에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 Table 1과 같다.

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총시료 118g을 3차 증류수 1000ml에 넣고 2시간씩 2회 환류추출한 후 얻은 전탕액을 면으로 여과하여 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 32.4g의 건조추출물을 얻어 27.46%의 수율을 보였다. 추출액을 DMEM 배지 110ml에 더하여 37℃에서 3시간 동안 교반(stirring)하였다. 이를 원심분리하여 상청액을 0.45µm 필터(Millipore사)로 여과하여 멸균하고 4℃에 보관하였다. 실험전에 추출액을 37℃에서 2시간 동안 배양하여 배지에 처리하였다.

2. 방법

1) 세포배양

HepG2 cell을 American Type Culture Collection

Table 1. Prescription of Chungganhaeju-tang

韓藥名	生藥名	Dose
茵蔯	Artemisiae capillaris Herba	30g
陳皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	12g
葛根	Puerariae Radix	12g
赤楊	Alny Cortex et Ramulus	12g
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	8g
茯苓	Hoelen	8g
澤瀉	Alismatis Rhizoma	8g
豬苓	Polyporus	8g
厚朴	Machili Cortex	8g
貢砂仁	Amomi Fructus	6g
甘草	Glycyrrhizae Radix	6g
Total		118g

(ATCC, Rockville, MD)에서 구입하여 10%의 FBS(fetal bovine serum)를 포함한 DMEM 배지에 배양하였다. 세포들은 5%의 CO₂ 상태가 유지되는 37 °C incubator에서 배양하였다.

2) 간세포에 대한 약물처리

HepG2 cell이 배양용기의 약 50-60% confluency를 나타내는 시점에서 ethanol과 acetaldehyde에 의한 ALDH의 발현을 유도하기 위하여 ethanol(1, 10 and 50mM) 또는 acetaldehyde(100, 200 and 400 μM)를 가하였다. 또한 淸肝解酒湯이 ALDH 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 여기에 1, 10, 100 μg/ml의 淸肝解酒湯을 48시간동안 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다. 처리가 끝난 세포들은 유전자 발현의 분석을 위해 trypsin-EDTA를 이용하여 배양용기에서 떼어내어 quantitative RT-PCR analysis에 사용하였다.

3) Quantitative RT-PCR

(1) RNA의 추출

① RNA를 얻기 위하여 세포에 처리할 solution D의 준비

250g의 guanidine isothiocyanate를 293ml의 3차 증류수에 넣은 후, 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 넣어 65 °C에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다. 이 GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 넣어 solution D를 준비하였다.

② 1 × 10⁷개의 세포에 solution D 500 μl, 2M sodium acetate(pH4.0) 50 μl를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 500 μl를 넣어 20초간 강하게 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

③ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여, 상층액에 cold isopropanol 1000 μl를 넣어 -70 °C에서 24시간 침전시켰다.

④ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, RNA pellete를 100% ethanol과 70% ethanol로 조심스럽게 세척하여 30 μl의 RNase-free water를 가하여 녹였다.

RNA의 양은 spectrophotometer (Schimadazu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA)를 이용하여 측정하였다. 260nm 파장에서의 흡광도와 280nm 파장에서의 흡광도 비(260/280)가 1.0이 될 때, RNA solution의 농도는 40 μg/ml가 된다.

(2) cDNA의 제작

① 각각의 실험군과 대조군에 대하여 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

Reverse transcriptase buffer	2 μl
Random hexamer (10 pM)	1 μl
MoMuLV-RT (10 U/μl)	1 μl
dNTP (10 pM)	1 μl
RNase inhibitor	0.5 μl
RNA	1 μg

② 혼합용액이 20 μl가 되도록 3차 증류수를 첨가한 후 23 °C에서 15분, 42 °C에서 1시간, 95 °C에서 5분간 방치하였다.

③ 각 시료에 80 μl 또는 160 μl의 증류수를 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

(3) Primer의 제작

Quantitative RT-PCR을 수행하기 위한 대조군으로는 house keeping gene인 GAPDH(Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase)를 선택하였다. 대조군과 target 유전자 각각의 primer 서열은 Table 2와 같다.

(4) Quantitative RT-PCR analysis

① 각각의 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10 × amplification buffer	10 μl
Mixture of dNTP (10 pM)	5 μl
GAPDH primer 1 (10 pM)	2 μl
GAPDH primer 2 (10 pM)	2 μl
Template cDNA	4 μl
H ₂ O	77 μl
Taq polymerase	0.25 μl

② Table 3의 조건으로 target 유전자에 대하여 36 cycles PCR반응을 시행하였다.

③ PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band

Table 2. Oligonucleotide primers used for quantitative RT-PCR analysis (All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Primer	Sequences	Orientation
GAPDH	1	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	sense
	2	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
ADH	1	AGCCAGAATCATTGCGGTGG	sense
	2	TTCCAGAGTGAAGCAGGTC	antisense
ALDH1	1	CTATGTGGCCAACCTGATCA	sense
	2	CGTTGCCCGGGCCAAGTCTC	antisense
ALDH2	1	CTCAAGAGAGTGACCTTGA	sense
	2	GTTGGCTCTCCAACAACCT	antisense
ALDH3	1	GCTTTAAGAGTAAATATTCTG	sense
	2	AATCTACTCTTTCCGAAGC	antisense

Table 3. Target Genes

Cycle	Denaturation	Annealing	Polymerization
First(1회)	5 min at 94℃	1 min at 59℃	1 min at 72℃
Subsequent(34회)	1 min at 94℃	1 min at 59℃	1 min at 72℃
Last(1회)	1 min at 94℃	1 min at 59℃	10 min at 72℃

의 밝기를 정량화하였다.

④ 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 ±20%이내로 정량화 하였다.

⑤ 위의 결과를 바탕으로 target 유전자에 대한 PCR반응을 시행하여 상대적인 정량화를 시행하였으며, target 유전자의 PCR조건은 Table 3과 동일하다.

4) Trypan blue exclusion assay

淸肝解酒湯이 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HepG2 cell이 60-70% confluency를 이룰 때, ethanol과 acetaldehyde를 각각 50mM, 400µM로 처리하였다. 여기에 淸肝解酒湯을 1, 10, 100 µg/ml의 농도로 48시간 처리하였다. 대조군으로는 Fas-mediated apoptosis signal을 차단하는 것으로 잘 알려진 anti-FasL neutralizing antibody를 ethanol과 acetaldehyde를 각각 50mM, 400µM로 처리한 HepG2 cell에 1, 5, 10 µg/ml를 가하여 48시간 처리하였다. 세포 사멸률을 측정하기 위해서 trypsin-EDTA로 떼어낸 세포를 원심분리하여 cell pellete를 얻은 후, 이를 다시 cold PBS(phosphate buffered saline)에서 5×10⁵ cells/ml가 되도록 재현탁하였다. 슬라이드에 0.5ml suspension을 준비하고, Trypan blue solution으로 염색한 후 현미경으로 death cell을 계수하여 총세포수와 의 비를 계산

하였다.

IV. 成績

1. 淸肝解酒湯이 ALDH 유전자 발현에 미치는 영향

1) Ethanol과 Acetaldehyde에 의한 ALDH 발현 유도
먼저 ethanol과 acetaldehyde에 의한 ALDH 발현 유도를 알아보기 위하여 인체 간세포주인 HepG2 cell에 각각 처리하였을 때, 처리농도에 비례하여 ALDH1, ALDH2, ALDH3의 mRNA 발현의 증가가 관찰되었다. ALDH1-3의 mRNA 발현증가는 ethanol 처리군에 비해 acetaldehyde 처리군에서 높았으며, ethanol 및 acetaldehyde 처리군 모두에서 ALDH1에 비해 ALDH2 및 ALDH3 발현이 큰 폭의 증가를 나타내었다. 그러나 HepG2 cell에서 ADH mRNA 발현은 검출되지 않았다(Table 4, 5, Fig. 1).

2) 淸肝解酒湯이 ALDH 유전자 발현에 미치는 영향

Ethanol 및 acetaldehyde에 의한 ALDH 유전자 발현에 淸肝解酒湯이 미치는 영향을 분석하기 위하여, 1, 10, 100µg/ml의 淸肝解酒湯을 처리한 후 50mM의 ethanol과 400µM의 acetaldehyde를 각각 처리하였다. 24시간 후 ALDH mRNA 발현의 변화유무를 quantitative RT-PCR을 이용하여 조사하였다. 본 실험

Table 4. Quantitative RT-PCR Analysis of ADH and ALDH mRNA Expression in Ethanol-treated HepG2 Cells

Ethanol (mM)	0	1	10	50
ADH	0.00	0.00	0.00	0.00
ALDH1	1.00	1.14	1.32	1.33
ALDH2	1.00	1.41	1.89	2.88
ALDH3	1.00	1.56	1.94	3.05

Cells were treated with ethanol for 24 hours

Table 5. Quantitative RT-PCR Analysis of ADH and ALDH mRNA Expression in Acetaldehyde-treated HepG2 Cells

Acetaldehyde (μM)	0	100	200	400
ADH	0.00	0.00	0.00	0.00
ALDH1	1.00	1.47	1.69	1.72
ALDH2	1.00	1.64	2.77	3.90
ALDH3	1.00	1.62	2.21	3.82

Cells were treated with acetaldehyde for 24 hours

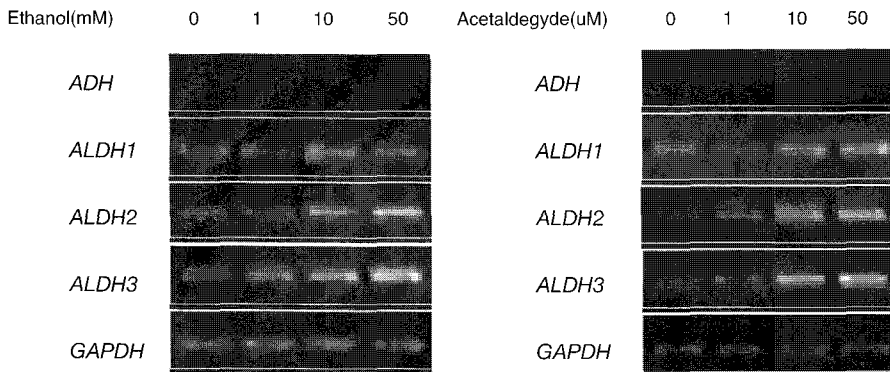


Fig. 1. Quantitative RT-PCR analysis of ADH and ALDH mRNA expression.

One μg of total cellular RNA extracted from ethanol- or acetaldehyde-treated cells was converted to cDNA by reverse transcription and 1:4 diluted cDNA was subjected to PCR amplification of ADH, ALDH, and an internal control gene, GAPDH. Ten μl of PCR products was resolved on a 2% agarose gel and its band intensities were scanned using a densitometry. The expression levels of each gene were determined as expression ratio, which were adjusted by intensities of GAPDH expression.

에서는 淸肝解酒湯이 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유도되는 ALDH의 mRNA 발현증가에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다(Table 6, 7, Fig. 2).

2. 淸肝解酒湯이 alcohol 유도성 cytotoxicity에 미치는 영향

Ethanol과 acetaldehyde에 의한 간세포 활성화에 대한 淸肝解酒湯의 영향을 분석하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 실험결과 ethanol과 acetaldehyde는 HepG2 cell의 활성을 현저히 저하시켰으며, 淸肝

解酒湯을 처리할 경우 처리농도에 비례하는 세포활성의 회복이 관찰되었다. 따라서 淸肝解酒湯은 alcohol에 의한 간세포 활성화저해를 억제 또는 회복시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Table 8, 9).

3. 淸肝解酒湯이 alcohol 유도성 apoptosis에 미치는 영향

1) Anti-FasL의 alcohol 유도성 apoptosis에 대한 작용
간세포의 apoptosis가 Fas 신호전달계와 연관되어 있는지를 알아보기 위하여, ethanol 및 acetaldehyde에

Table 6. Effect of Chungganhaeju-tang on Ethanol-mediated Induction of ALDH mRNA Expression

Chungganhaeju-tang($\mu\text{g/ml}$)	Ethanol (50 mM)				
	-	+	+	+	+
	0	0	1	10	100
ALDH1	1.00	1.29	1.33	1.26	1.31
ALDH2	1.00	2.69	2.74	2.68	2.79
ALDH3	1.00	3.14	3.12	3.20	3.11

Table 7. Effect of Chungganhaeju-tang on Acetaldehyde-mediated Induction of ALDH mRNA Expression

Chungganhaeju-tang($\mu\text{g/ml}$)	Acetaldehyde (400 μM)				
	-	+	+	+	+
	0	0	1	10	100
ALDH1	1.00	1.61	1.66	1.68	1.72
ALDH2	1.00	3.87	3.70	3.80	3.79
ALDH3	1.00	3.73	3.61	3.77	3.69

Table 8. Effect of Chungganhaeju-tang on Cytotoxicity of Ethanol (MTT Assay)

Chungganhaeju-tang($\mu\text{g/ml}$)	Ethanol (50 mM)				
	-	+	+	+	+
	0	0	1	10	100
Exp. 1	0.267	0.117	0.143	0.197	0.212
Exp. 2	0.258	0.112	0.139	0.181	0.209

Cells were treated with Chungganhaeju-tang and ethanol for 48 hours

Table 9. Effect of Chungganhaeju-tang on Cytotoxicity of Acetaldehyde (MTT Assay)

Chungganhaeju-tang($\mu\text{g/ml}$)	Acetaldehyde (400 μM)				
	-	+	+	+	+
	0	0	1	10	100
Exp. 1	0.232	0.104	0.133	0.173	0.205
Exp. 2	0.229	0.102	0.130	0.174	0.214

Cells were treated with Chungganhaeju-tang and acetaldehyde for 48 hours

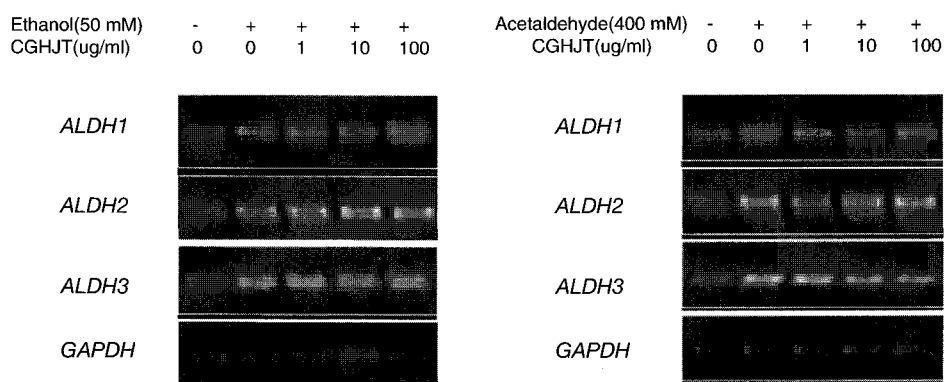


Fig. 2. Effect of Chungganhaeju-tang on ALDH induction by ethanol or acetaldehyde.

One μg of total cellular RNA extracted from Chungganhaeju-tang-treated cells in the presence or absence of ethanol or acetaldehyde was converted to cDNA by reverse transcription and 1:4 diluted cDNA was subjected to PCR amplification of ALDH, and an internal control gene, GAPDH. Ten μl of PCR products was resolved on a 2% agarose gel and its band intensities were scanned using a densitometry. The expression levels of each gene were determined as expression ratio, which were adjusted by intensities of GAPDH expression.

의한 간세포 사멸이 Fas-mediated apoptosis에 의해 유도되는지를 조사하였다. 이를 위해 Fas ligand와 결합하여 이의 기능을 억제하는 anti-FasL neutralizing antibody에 의하여 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 apoptosis가 억제되는가를 분석하였다. 실험결과 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 HepG2 cell의 apoptosis는 anti-FasL neutralizing antibody를 처리할 경우 현저하게 억제되었으며, 이 억제효과는 처리농도에 비례함을 확인할 수 있었다(Table 10, 11).

2) 淸肝解酒湯이 alcohol 유도성 apoptosis에 미치는 영향

ethanol 및 acetaldehyde에 의한 간세포손상과 이에 대한 淸肝解酒湯의 영향을 분석하기 위하여 Trypan blue exclusion assay를 이용하여 apoptosis를 측정하였다. 앞의 실험에서는 ethanol과 acetaldehyde 처리는 HepG2 cell의 apoptosis를 현저히 유발함이 관찰되었으며, 반면 본 실험에서는 淸肝解酒湯이 ethanol 및

acetaldehyde가 유발하는 apoptosis를 강력하게 억제함을 확인하였다. 淸肝解酒湯에 의한 apoptosis억제는 처리농도에 비례하였으며, 100 μ g/ml 처리군에서는 ethanol과 acetaldehyde에 의해 유도되는 apoptosis가 거의 대부분 억제됨이 발견되었다. 따라서 淸肝解酒湯은 alcohol 유도성 간세포 사멸을 강력하게 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Table 12, 13).

V. 考 察

술은 熱性이 있어 에너지원이 되거나 유대감을 높여주는 긍정적인 측면도 있지만, 부정적인 면이 많아 산화과정 중에 생기는 毒性으로 인해 사람의 精氣를 枯渴시키고 성품을 변화시키며 인체에 여러 가지 손상을 일으키게 된다.

한의학에서는 음주로 인한 內傷을 酒傷이라 하여, 이에 관한 기록을 內經에서부터 찾아볼 수 있는데,

Table 10. Suppression of Ethanol-induced Apoptosis by Anti-FasL Antibody (Trypan Blue Exclusion Assay: death cells/total cells)

anti-FasL(μ g/ml)	Ethanol (50 mM)				
	-	+	+	+	+
	0	0	0	5	10
Exp. 1	419/2000	1278/2000	1103/2000	845/2000	569/2000
Exp. 2	448/2000	1219/2000	1056/2000	716/2000	518/2000

Cells were treated with anti-FasL and ethanol for 48 hours

Table 11. Suppression of Acetaldehyde-induced Apoptosis by Anti-FasL Antibody (Trypan Blue Exclusion Assay: death cells/total cells)

Acetaldehyde (400 μ M)	Exp. 1				
	-	+	+	+	+
anti-FasL(μ g/ml)	0	0	0	5	10
Exp. 1	419/2000	1267/2000	1088/2000	717/2000	512/2000
Exp. 2	448/2000	1264/2000	1052/2000	690/2000	525/2000

Cells were treated with anti-FasL and acetaldehyde for 48 hours

Table 12 Induction of Apoptosis by Ethanol and its Inhibition by Chungganhaeju-tang (Trypan Blue Exclusion Assay: death cells/total cells)

Ethanol (50 mM)	Exp. 1				
	-	+	+	+	+
Chungganhaeju-tang(μ g/ml)	0	0	1	10	100
Exp. 1	447/2000	1377/2000	1021/2000	802/2000	551/2000
Exp. 2	452/2000	1409/2000	996/2000	662/2000	494/2000

Cells were treated with Chungganhaeju-tang and ethanol for 48 hours

Table 13 Induction of Apoptosis by Acetaldehyde and its Inhibition by Chungganhaeju-tang (Trypan Blue Exclusion Assay: death cells/total cells)

Acetaldehyde (400 μ M) Chungganhaeju-tang (μ g/ml)	Exp. 1				
	- 0	+ 0	+ 1	+ 10	+ 100
Exp. 1	447/2000	1472/2000	1109/2000	790/2000	511/2000
Exp. 2	452/2000	1462/2000	1083/2000	692/2000	478/2000

Cells were treated with Chungganhaeju-tang and acetaldehyde for 48 hours

《靈樞·論勇篇》에서는 酒氣가 標悍한데 飲酒하면 氣가 上逆하여 胸中에 充滿하여 肝浮膽橫하고 그 常性을 잃고 酒悖가 된다고 하였고, 《素問·厥論篇》에서는 醉飽入房하면 氣가 胸中에 쌓여 흠어지지 않고 酒氣와 穀氣가 相搏하여 中焦盛熱하게 되므로 全身에 熱이 퍼지고 內熱이 생겨 尿赤한다고 하였으며, 《素問·生氣通天論》에서는 大飲하면 氣가 逆한다고 하여, 과음으로 인한 氣의 變調와 병리현상에 대해 기술하고 있다.

이후 張⁶은 과음으로 인한 黃疸을 酒疸로 기술하였으며, 巢⁷는 酒疸, 酒癖에 대해 언급하고 臟器의 虛實에 따른 변화를 관찰하였다. 李⁸는 酒傷病의 치료는 瀉下시키게 되면 絶命하거나 虛損病이 생기게 되므로 治法은 發散汗出하고 다음으로 利小便하여 그 濕을 上下로 分消시켜야 한다고 하였다. 또한 酒傷의 병인병리는 濕毒뿐만 아니라 痰飲의 대사이상이 관여하는 것으로도 파악하고 있다.

淸肝解酒湯은 酒傷에 대표적인 처방으로 濕痰을 제거하는 對金飲子에 淸熱利濕하는 茵陳四苓散을 合方하고 解酒毒의 要藥인 葛根, 赤楊 등을 가미하여 구성된 방제이다. 淸肝解酒湯에 대한 연구로 郭⁹은 淸肝解酒湯이 알코올 대사과정에서 acetaldehyde의 생성을 억제하고 알코올에 의해 저하된 간기능을 회복시키는 작용이 있음을 보고하였고, 李¹⁰는 알코올성 지방간 환자에 있어 淸肝解酒湯 투여후 혈청 AST, ALT, GGT, TG가 통계적으로 유의한 감소가 있음을 보고하였다.

淸肝解酒湯을 구성하는 약물 중 對金飲子和 관련된 연구로는 金¹¹과 柳¹²가 알코올로 인한 酒傷病에 加味對金飲子가 肝機能회복에 유의성이 있음을 보고

하였다. 茵陳四苓散과 관련된 연구로는 禹¹³가 茵陳五苓散과 茵陳을 증량한 構成方이 흰쥐 損傷肝에 미치는 영향을 보고하였고, 李¹⁴는 간보호작용과 이담 작용 및 지질강화작용 등의 효능이 있음을 보고하였다. 朴¹⁵은 알코올로 유발된 흰쥐의 간손상으로 인한 지질대사, 당질대사, 단백질대사의 이상으로 인한 혈청중 triglyceride, glucose, BUN 함량의 증가에 대해 모두 유의한 억제효과가 있음을 보고하였다.

Acetaldehyde를 분해하는 aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 경우, 4가지 정도의 아형이 알려져 있으나 실제로 acetaldehyde의 산화에 관계하는 것은 ALDH1과 ALDH2의 두 가지이다. ALDH1이 세포질에 존재하고 고농도의 acetaldehyde에서 작용하는데 비해, ALDH2는 mitochondria에 존재하고 낮은 농도의 acetaldehyde를 처리하므로, ALDH2의 역할이 좀 더 중요하게 여겨진다. 만성 음주로 ALDH의 활성이 줄지는 않지만, 간경변같은 심각한 간질환에서는 전체 총량의 ALDH활성이 감소되는데, 고농도의 acetaldehyde 때 작용하는 ALDH의 감소도 발견되나 주로 낮은 농도에서 작용하는 ALDH의 활성감소에 기인한다^{17,18}. 또한 전체 효소 활성도는 별로 변화하지 않아도 각 isoenzyme의 활성도가 영향을 받기도 하기 때문에¹⁹, 더욱 상세한 생화학적 설명을 위해 전체 활성도 외에 각 효소의 활성도를 차별적으로 측정해야 할 것이다. 이상과 같이 알코올성 간질환은 알코올 및 그 중간대사물질 자체의 독성에 의한 손상, 또는 알코올대사 과정에서 발현되는 손상이 그 중요한 원인이라고 알려지고 있다.

간질환을 포함하여 인체내 정상적인 생리기능손상에 대한 최근의 연구경향은 점차 면역학적인 관점에

서 관찰되고 있는데, 방법론적으로는 세포단위의 대사 및 apoptosis에 관여하는 단백질, DNA, RNA의 활성에 따라 발병원인과 변화과정을 물질대사의 상관관계로 판정할 수 있다는 가설²⁰에서 출발하고 있다.

Fas(Apo1/CD95), Fas ligand(FasL), anti-Fas neutralizing antibody는 간세포의 apoptosis에 서로 밀접한 관련을 갖는다. Fas(Apo1/CD95)는 45 kDa의 당화 I형 막수용체(glycosylated type I transmembrane receptor)로 마우스의 단일클론항체인 세포표면단백질이며 특이작용항체와 교차결합하여 apoptosis를 조절한다. 또한 FasL는 40 kDa의 당화 II형 막단백질(glycosylated type II transmembrane protein)로 tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily에 속해 있는 세포표면물질이며, Fas 발현시에 이와 결합하여 세포의 apoptosis를 유발하는데 있어 각각 사망인자와 수용체로서 작용하게 된다²¹.

최근 Fas signal과 연관된 apoptosis에 대한 연구는 주로 virus성 간염에서 많이 연구되고 있는데, 간세포에서 Fas-induced apoptosis가 수행되려면 protein kinase inhibitor와 translation inhibitor, Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like, Cpp32-like cysteine protease도 필요하다²¹. B형간염 virus에 감염된 세포는 cytotoxic T lymphocyte(CTL)가 관여하는 면역반응으로 손상된다. CTL의 표면에서 인지되는 FasL은 Fas antigen과 부착하므로서 apoptosis가 시작된다. 또한 만성 B형간염에서도 Fas antigen과 FasL의 상호작용이 간손상에 중요한 역할을 하고²², 아울러 C형 virus를 가진 만성활동성 간염환자에서도 Fas antigen이 많이 발견되고 있다²³. 따라서 Fas는 간질환을 악화시키는 주요 요인으로 인식되고, 이를 억제하는 방법을 찾는 연구가 여러 분야에서 지속되고 있다.

최근 연구에서는 HepG2 cell을 ethanol에 노출시켰을 때 나타나는 apoptosis가 Fas-receptor pathway와 연관되어 있다는 연구도 보고 되고 있다^{24,25}. 또한茵陳四苓散 butanol 추출물이 HepG2 cell의 활성을 높이고 Fas-mediated apoptosis를 강력히 억제한다고 보고되고 있으며²⁶,茵陳 butanol분획의 TLC 추출결과 검출된 scopoletin이 간세포의 활성을 높이고 Fas-

mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포 손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효과가 있음이 보고되었다²⁷.

이와 같은 내용을 바탕으로, 본 연구에서는 간세포의 보호작용이 있는 것으로 추정되는 淸肝解酒湯이 알코올 대사관련 효소의 유전자 발현 및 cytotoxicity에 미치는 영향과 Fas를 매개로한 apoptosis에 미치는 영향을 분자생물학적으로 검증하고자 HepG2 cell을 이용하여 실험을 진행하였다.

淸肝解酒湯의 실험에 앞서, ethanol과 acetaldehyde를 인체 간세포주인 HepG2 cell에 각각 처리하여 ALDH의 유전자 발현에 대하여 관찰하였는데, 실험결과 ethanol과 acetaldehyde 처리농도에 비례하여 ALDH1-3 유전자의 mRNA 발현이 증가함이 관찰되었다. 그러나 HepG2 cell에서 ADH mRNA 발현은 검출되지 않았는데, 이는 HepG2 cell이 ADH 유전자결손을 가지고 있다는 기존의 보고와 일치하는 것이다^{28,29}. Quantitative RT-PCR을 이용하여 조사한 결과, 淸肝解酒湯은 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유도되는 ALDH mRNA 발현에는 별다른 영향을 미치지 않음이 관찰되었다.

淸肝解酒湯의 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 간세포 활성저하에 대한 영향을 분석하였는데, 먼저 ethanol과 acetaldehyde는 HepG2 cell의 활성을 현저히 저하시킴을 확인할 수 있었으며, 이어서 수행한 실험에서는 淸肝解酒湯의 처리농도에 비례하는 세포 활성의 회복이 관찰되었다. 따라서 淸肝解酒湯은 alcohol에 의한 간세포 활성저하를 억제 또는 회복시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

최근의 연구들은 alcohol에 의한 간세포의 apoptosis에 Fas 신호전달계가 중요한 역할을 하고 있음을 보고하고 있다^{24,25}. 따라서 본 연구에서는 대조군으로서 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 간세포 사멸이 Fas-mediated apoptosis에 의해 유도되는지를 확인하였는데, 이를 위해 Fas ligand와 결합하여 이의 기능을 억제하는 anti-FasL neutralizing antibody에 의하여 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 apoptosis가 억제되는가를 Trypan blue exclusion assay를 수행하여

분석하였다. 실험을 수행한 결과 anti-FasL neutralizing antibody로 처리할 경우, ethanol 및 acetaldehyde에 의한 HepG2 cell의 apoptosis는 현저하게 억제되었으며, 이 억제효과는 처리농도에 비례함을 확인할 수 있었다.

淸肝解酒湯의 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 간세포 손상과 이에 대한 영향을 분석하기 위하여 Trypan blue exclusion assay를 이용하여 apoptosis를 측정하였는데, ethanol과 acetaldehyde 처리는 HepG2 cell의 apoptosis를 현저히 유발함이 관찰되었으며, 실험결과 淸肝解酒湯이 ethanol 및 acetaldehyde가 유발하는 apoptosis를 강력하게 억제함이 확인되었다. 淸肝解酒湯에 의한 apoptosis억제 정도는 처리농도에 비례하였으며 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 ethanol과 acetaldehyde에 의해 유도되는 apoptosis가 거의 대부분 억제됨이 발견되었다. 따라서 淸肝解酒湯은 alcohol 유도성 간세포 사멸을 강력하게 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

최근에 발표된 茵蔯 및 茵蔯四苓散이 Fas-mediated apoptosis를 억제한다는 연구결과에 기초할 때^{26,27}, ethanol 및 acetaldehyde가 유발하는 간세포 apoptosis를 淸肝解酒湯이 강력히 억제한다는 본 연구결과는 淸肝解酒湯에 의한 Fas-mediated apoptosis 억제 가능성을 시사하고 있다고 추측되며, 향후 이와 관련된 연구가 좀 더 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 淸肝解酒湯이 간세포 활성을 높이고, alcohol 유도성 apoptosis를 억제하는 등의 간보호 작용에 대한 구체적 작용기전에 대한 연구도 좀 더 필요하리라 사료된다.

VI. 結 論

淸肝解酒湯이 alcohol 대사관련 유전자에 미치는 영향을 알아보기 위하여, HepG2 cell을 대상으로 ethanol과 acetaldehyde 및 淸肝解酒湯을 처리하여, ALDH 유전자 발현의 확인을 위해 quantitative RT-PCR 실시하였고, 간세포의 활성과 apoptosis에 미치는 영향을 확인하고자 MTT assay 및 Trypan blue

exclusion assay를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Quantitative RT-PCR analysis 결과, ethanol과 acetaldehyde의 농도에 따라 ALDH1, ALDH2, ALDH3 유전자의 mRNA 발현이 증가함이 관찰되었으며, ALDH1에 비해 ALDH2 및 ALDH3의 발현이 큰 폭으로 증가하였다.
2. 淸肝解酒湯은 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 ALDH 유전자 발현에 대하여 영향을 미치지 않았다.
3. 淸肝解酒湯은 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유발되는 간세포 활성저하에 대하여 농도에 따라 비례하여 억제하였으며, 간세포를 회복시키는 효과를 확인할 수 있었다.
4. 淸肝解酒湯은 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유발되는 간세포의 apoptosis를 농도에 따라 비례하여 억제하는 효과를 확인할 수 있었다.

이상에서 淸肝解酒湯은 ethanol과 acetaldehyde에 의해 저하된 간세포의 활성을 높이고 alcohol 유도성 apoptosis를 억제하는 간보호 작용이 있음을 확인하였다. 향후 알코올대사와 관련해서는 심도있는 연구가 좀 더 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 통계청. 2001 한국의 사회지표. 2002, 294-7, 300-3.
2. 통계청. 2001 사망원인 통계연보. 2002; 7-13, 20-32.
3. 전국 한의과대학 간계내과학 교수 공저. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원 출판부; 2001, 95, 118-24, 223, 262, 304-14, 830-43.
4. 洪元植 校合. 精校黃帝內經靈樞. 서울: 東洋醫學研究院; 1985, 233.
5. 洪元植 校合. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究院; 1985, 17, 169.
6. 張仲景. 金匱要略. 서울: 杏林書院; 1978, 74-6, 119-20, 392-4, 438.
7. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 北京: 人民衛生出版社; 1983, 395-7, 598, 619-20, 750-3, 768-9.
8. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 최신지견내과학 II. 서울: 군자출판사; 1998, 18-27.
9. 광미애, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올 대사

- 및 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000; 21(1):68-76.
10. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지 2001;22(4):107-13.
 11. 김영철, 우홍정, 김병운. 加味對金飲子の 효능에 대한 실험적 연구. 경희한의대논문집 1993;16:7-29.
 12. 류기원, 구분홍. 酒傷病에 응용되는 加味對金飲子가 Ethanol로 인한 白鼠의 간손상에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1980;3(3):1-14.
 13. 박형규, 김동우, 이장훈, 우홍정, 김병운. 茵陳四?散이 급성 Alcohol, 고지혈증 및 Galactosamine중독 白鼠의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지 1993; 14(2):254-69.
 14. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울: 大星文化社; 1983, 56-7, 119, 161, 491.
 15. 우홍정. 茵陳五苓散과 茵陳 증량한 구성방이 흰쥐 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지 1994;13(1): 234-41.
 16. 이장훈. 간질환치료제의 효능에 관한 실험적 연구. 제2회 韓中 학술대회 참가논문집 -간장편-. 대한한의사협회; 1995, 123-63.
 17. 김원동편저. 내과학의 최신지견 II. 서울: 한국의학; 1998, 143-55.
 18. Keung W.M., Vallee B.L. Daidzin and dzidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian golden hamsters. Proc Natl Acad Soc USA 1993;90:21.
 19. Keung W.M., Vallee B.L. Therapeutic lessons from traditional oriental medicine to contemporary occidental pharmacology. EXS 1994;71:371-81.
 20. Jacobson M. D., Weil M. and Raff M. C. Programmed cell death in animal development. Cell 1997;88:347-54.
 21. Rouquet N., Carlier K., Briand P., Wiels J., and Joulin V. Multiple pathways of Fas-induced Apoptosis in primary Culture of Hepatocytes, Bio. and Biophys. Res. COM 1996;229:27-35.
 22. Mochizuki K., Hayashi N., Hiramatsu N., Katayama K., Kawanishi K., Kasahara A. et al. Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. J Hepatology 1996;24(1):1-7.
 23. Hiramatsu N., Hayashi N., Katayama K., Mochizuki K., Kawanishi Y., Kasahara A. et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. J Hepatology 1994;19(6):1354-9.
 24. F. Castaneda, R.K.H. Kinne. Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas-receptor pathway. J Cancer Res Clin Oncol 2001;127:418-24.
 25. F. Castaneda, R.K.H. Kinne. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. J Cancer Res Clin Oncol 2000;126:503-10.
 26. 고흥, 이장훈, 우홍정. 茵陳四苓散 Butanol 추출물에 의한 간세포 Fas-mediated Apoptosis의 억제작용. 대한한의학회지 2002;21(3):174-85.
 27. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳 butanol 분획의 TLC 추출성분이 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지 2002;23(2):57-69.
 28. Dahn L. Clemens, Christine M. Halgard, Rodney R. Miles, Michael F. Sorell, and Dean J. Tuma. Establishment of a Recombinant Hepatic Cell Line Stably Expressing Alcohol Dehydrogenase. Archives of Biochemistry and Biophysics 1995;321(2):311-8.
 29. Jose M. Jimenez-Lopez, Maria P. Carrasco, Josefa L. Segovia, Carmen Marco. Resistance of HepG2 cells against the adverse effects of ethanol related to neutral lipid and phospholipid metabolism. Biochemical Pharmacology 2002;63:1485-90.