

# 茵陳清肝湯이 kupffer cell의 inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향

김지권, 김영철, 이장훈, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

## The Effects of *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*) on Inflammatory Cytokine Gene Expression in Kupffer Cells

Ji-Kwon Kim, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

**Objectives** : This study was designed to investigate the effects of *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*) on the expression of inflammatory cytokine genes and proteins in kupffer cells.

**Materials and Methods** : The mRNA expression level and protein secretion level were measured using quantitative RT-PCR and ELISA assay respectively in *Injinchunggan-tang*-treated and untreated kupffer cells after exposed to ethanol, acetaldehyde and lipopolysaccharide.

**Results** : *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*) reduced mRNA expression level and protein secretion level of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 that are induced by ethanol, acetaldehyde and lipopolysaccharide in kupffer cells and that mediate inflammation and fibrosis of liver.

**Conclusion** : The result indicates that *Injinchunggan-tang* (*Yinchenqinggan-tang*) blocks alcohol-induced liver injury and protects liver by reducing production of inflammatory cytokines.

**Key Words**: *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*), kupffer cell, cytokine

### I. 緒 論

최근 십여년간 꾸준히 B형 간염 예방정책이 시행되면서 B형 간염 바이러스 보유율이 점차 감소하고 있음에도, 여전히 B형肝炎 바이러스 보유율은 우리나라 성인 인구의 약 5%에 이르고 있어<sup>1</sup>, 만성 간질환의 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 한편, 과거 비교적 이환율이 낮았던 C형 간염 바이러스 보유율이 점점 증가하고 있으며<sup>2</sup>, 습관성 음주자의 증

가로 인하여 알코올성 간질환 환자의 발생 역시 점차 증가하고 있다<sup>3</sup>. 이러한 각종 肝疾患은 우리나라 40~50대 남성 사망률을 높이는 주요한 원인으로 나타나고 있어<sup>4</sup>, 개인 뿐 아니라 사회적 차원에서도 지속적 관심을 가져야할 문제이다.

茵陳清肝湯<sup>5</sup>은 清熱利濕시키는 茵陳四苓散<sup>6</sup>에 地榆 覆盆子 蘿菔子 靑皮 砂仁 등을 가미한 처방으로 안전성 시험과 간질환의 임상 효과에 대한 검증을 거쳐 임상에서 急慢性 肝疾患의 치료에 폭넓게 사용되고 있다. 茵陳清肝湯은 기존의 연구를 통해 임상용량으로 경구투여 시 부작용을 일으키지 않음이 확인되어 그 안전성이 검증되었고<sup>7</sup>, 전격성 간염을 일으킨 마우스의 생존률을 높이는 효과가 있음이

· 접수 : 2004년 1월 24일 · 채택 : 2004년 3월 10일  
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지  
경희의료원 한방병원 간계내과학교실  
(Tel. 02-958-9118 Fax. 02-958-9120 E-mail :  
hjwoo@khu.ac.kr)

보고되었으며<sup>8</sup>, 실험적 肝硬變症이 유발된 마우스에 대하여 간기능개선, 간보호, 간손상회복, 재생에 유의한 효과가 있음이 보고되었다<sup>9</sup>. 또한 최근에는 茵蔯清肝湯의 효능을 분자생물학적인 접근을 통해 검증하려는 연구도 지속적으로 시도되고 있다.

Liver macrophage인 kupffer cell은 각종 간질환에 있어 염증 반응의 매개자로서 그 역할에 관한 보다 자세한 연구가 현재에도 지속적으로 이루어지고 있다. Kupffer cell은 B형 및 C형 바이러스성 간염에서 뿐만 아니라, 알코올성 간질환에서도 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 와 같은 inflammatory cytokines을 분비하여 염증 및 섬유화 반응을 매개하는 것으로 알려져<sup>10-12</sup>, kupffer cell에서의 inflammatory cytokine 발현을 억제시킬 경우 간질환을 개선시키는 효과가 있을 것으로 기대된다.

이에 저자는 茵蔯清肝湯이 kupffer cell의 inflammatory cytokines 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 茵蔯清肝湯을 전 처리한 kupffer cell에 각각 ethanol, acetaldehyde, endotoxin (lipopolysaccharide)을 투여한 다음, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 mRNA 및 각 cytokine의 protein 발현 정도를 측정하여, 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해<sup>13</sup>에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 아래 표와 같다.

#### 2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 茵蔯清肝湯 10첩 분량(740g)을 3차증류수 4.8ℓ를 가하여 2시간 썬 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 증탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 86.7g의 건조추출물을 얻어 11.71%의 수율을 보였다.

### 2. 方法

#### 1) Kupffer cell의 분리 및 배양

Kupffer cell은 건강한 male Wistar rat (240-280g)의 liver로부터 collagenase와 pronase를 이용한 sequential in situ perfusion method를 통해 분리하였다. Rat liver로부터 얻어진 간세포들은 arabinogalactan gradient (1.034, 1.043, 1.058,

### Prescription of Injinchunggan-tang

韓藥名	生藥名	Dose
茵 蔯	Artemisiae Capillaris Herba	25g
地 榆	Sanguisorbae Radix	8g
覆盆子	Rubi Fructus	6g
白 朮	Atractylodis Rhizoma Alba	6g
豬 苓	Polyporus	6g
白茯苓	Hoelen	6g
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	4g
蘿菔子	Raphani Semen	4g
青 皮	Aurantii Immatri Pericarpium	3g
砂 仁	Amomi Semen	3g
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3g
Total		74g

1.085)를 이용하여 원심분리하였으며, kupffer cell은 density 1.043과 1.058 사이에 존재하는 세포를 취함으로서 얻었다. 분리된 kupffer cell은  $1 \times 10^5$  cells/well 밀도로 plastic culture dish를 이용하여 배양하였으며 2시간 후에 washing을 통하여 non-adherent cell을 제거하였다.

## 2) 검액의 처리

우선茵陳清肝湯이 kupffer cell의 inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 kupffer cell을  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 0.05%의 bovine albumine이 포함된 RPMI1640로 배양한 후茵陳清肝湯을 1, 10, 50, 100 $\mu$ g/ml의 농도로 48시간 동안, 또한 10 $\mu$ g/ml의 농도로 12, 24, 48, 72 시간동안 처리하였다. Ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide (LPS)에 의한 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 ethanol(1, 10, 50mM), acetaldehyde(100, 200, 400 $\mu$ M), LPS(1, 5, 10 $\mu$ g/ml) 투여 6 시간전에茵陳清肝湯을 처리하였다.茵陳清肝湯을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포(대조군)는 0.1% trypsin으로 회수하였으며 유전자 발현을 분석하기 위하여 protein 및 RNA를 추출하였다.

## 3) 정량적 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현의 분석

### (1) RNA의 추출

RT-PCR 분석을 위한 RNA는 아래와 같은 방법으로 추출하였다.

- ① 250g의 guanidine isothiocyanate을 293ml의 3차 증류수에 넣은 후 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다. 이와 같이 제작된 GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 첨가함으로써 Solution D를 제작하였다.
- ② 세포배양으로부터 회수된 세포에 solution D 500 $\mu$ l, 2M sodium acetate(pH4.0) 50 $\mu$ l를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500 $\mu$ l, chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 100 $\mu$ l를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.
- ③ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여

상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000 $\mu$ l를 넣어 -70 $^{\circ}$ C에서 24시간 침전시켰다.

- ④ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA pellete을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30 $\mu$ l의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

### (2) cDNA의 제작

- ① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다 ; Reverse transcriptase buffer 2 $\mu$ l, Random hexamer (10pM) 1 $\mu$ l, AMV-RT (10U/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l, dNTP (10pM) 1 $\mu$ l, RNase inhibitor 0.5 $\mu$ l, RNA 1 $\mu$ g
- ② 혼합용액이 20 $\mu$ l가 되도록 sterile water를 첨가한 후 42 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하였다.
- ③ 각 시료에 80 $\mu$ l의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

### (3) Primer의 제작

House keeping gene인 GAPDH(Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase)와 target genes인 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 primers를 사용하였다.

### (4) Quantitative RT-PCR

- ① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다 ; 10 $\times$  amplification buffer 10 $\mu$ l, Mixture of dNTP (10pM) 5 $\mu$ l, primer1 (10pM) 2 $\mu$ l, primer2 (10pM) 2 $\mu$ l, Template cDNA 4 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 77 $\mu$ l
- ② 상기한 mRNA-specific primer를 이용하여 아래의 조건으로 34-40cycle의 PCR 반응을 시행하였다.
  - a. First cycle : Denaturation (5min at 94 $^{\circ}$ C), Annealing (1min at 59 $^{\circ}$ C), Polymerization (1min at 72 $^{\circ}$ C)
  - b. Subsequent cycles (32-38cycles) : Denaturation (1 min at 94 $^{\circ}$ C), Annealing (1 min at 59 $^{\circ}$ C), Polymerization (1 min at 72 $^{\circ}$ C)
  - c. Last cycle : Denaturation (1 min at 94 $^{\circ}$ C),

Oligonucleotide Primer Sequences Used for Quantitative RT-PCR Analysis(All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Orientation	Primer nucleotide sequences
GAPDH	Sense	5'-TGACTGTCCGATTGTCAATCCAGGCT-3'
	Antisense	5'-GACATGGATCCCACGAAATCTAGCGAC-3'
TNF-α	Sense	5'-GATCCAGCGACTGCATCGAGATCCTC-3'
	Antisense	5'-TGCCTAGTTGACAATCGAATGCCGCT-3'
TGF-β1	Sense	5'-AAATCAGTCGGAGCTGGACTCGAGCTA-3'
	Antisense	5'-CGGCTAGGGCAAACACGATCGGATTGA-3'
IL-1β	Sense	5'-GACAGCTAAGAGAGCTTTGACGCCCTC-3'
	Antisense	5'-AACGACTGATTGGGACACTACAGAGAG-3'
IL-6	Sense	5'-TTATCACGACAGCTAGAGTCGGGCGCT-3'
	Antisense	5'-CGCGGGCATCTATCATCTATTTCGACGG-3'
IL-8	Sense	5'-AATACAGAGCGCTGCTGATCGATCGCGC-3'
	Antisense	5'-AGAGCGGTCACACTGCGACGTATAGCT-3'

Annealing (1 min at 59°C), Polymerization (10 min at 72°C)

③ PCR products를 2% agarose gel을 이용하여 전기영동(100volts, 20분)한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 정량화하였다.

4) ELISA를 이용한 cytokine 단백질 발현분석

TNF-α, TGF-β1, IL-1β, IL-6, IL-8 단백질의 발현 분석을 위해 세포배양액으로 분비된 각 cytokine 양을 human ELISA system (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 정량하였다. 즉 50μl의 배양액과 biotin-conjugated antibody를 혼합한 후 약 2시간 실온에 방치하였으며 horseradish peroxidase-conjugated streptavidin과 tetramethyl benzidine (TMB) substrate를 혼합한 후 450nm 에서의 optical density(OD)값을 microplate reader를 이용하여 분석하였다.

III. 結 果

1.茵陳清肝湯이 kupffer cell의 TNF-α 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 kupffer cell에서 TNF-α mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여, kupffer

cell(1×10<sup>5</sup>cells/well)에茵陳清肝湯을 각각 1, 10, 50, 100μg/ml의 농도로 48시간 처리하고, 10μg/ml의 농도로 각각 12, 24, 48, 72시간 처리하였다. 대조군에는茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 처리가 끝난 다음에는 quantitative RT-PCR을 통해 target gene에서 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 그 결과,茵陳清肝湯의 처리 농도와 처리 시간에 비례하여 kupffer cell의 TNF-α mRNA 발현량이 감소하였다 (Table 1).

2.茵陳清肝湯이 kupffer cell의 TGF-β1 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 kupffer cell에서 TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여, kupffer cell(1×10<sup>5</sup>cells/well)에茵陳清肝湯을 각각 1, 10, 50, 100μg/ml의 농도로 48시간 처리하고, 10μg/ml의 농도로 각각 12, 24, 48, 72시간 처리하였다. 대조군에는茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 처리가 끝난 다음에는 quantitative RT-PCR을 통해 target gene에서 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 그 결과,茵陳清肝湯의 처리 농도와 처리 시간에 비례하여 kupffer cell의 TGF-β1 mRNA 발현량이 현저하게 감소하였다(Table 2).

3. 茵陳清肝湯이 kupffer cell의 IL-1 $\beta$  발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 kupffer cell에서 IL-1 $\beta$  mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여, kupffer cell( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을 각각 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 처리하고, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 12, 24, 48, 72시간 처리하였다. 대조군에는 茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 처리가 끝난 다음에는 quantitative RT-PCR을 통해 target gene 들에서 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 그 결과, 茵陳清肝湯의 처리 농도와 처리 시간에 비례하여 kupffer cell의 IL-1 $\beta$  mRNA 발현량이 다소 감소하였다(Table 3).

4. 茵陳清肝湯이 kupffer cell의 IL-6 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 kupffer cell에서 IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여, kupffer cell( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을 각각 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 처리하고, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 12, 24, 48, 72시간 처리하였다. 대조군에는 茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 처리가 끝난 다음에는 quantitative RT-PCR을 통해 target gene 들에서 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 그 결과, 茵陳清肝湯의 처리 농도와 처리 시간에 비례하여 kupffer cell의 IL-6 mRNA 발현량이 감소하였다 (Table 4).

Table 1. TNF- $\alpha$  Expression Level in Kupffer Cells after *Injinchunggan-tang* (IJCGT) Treatment

	Control	IJCGT treated ( $\mu\text{g/ml}$ ; 48hrs)				Control	IJCGT treated (hrs; 10 $\mu\text{g/ml}$ )				
		1	10	50	100		12	24	48	72	
Exp. 1	1.00	0.96	0.86	0.72	0.62	Exp. 3	1.00	0.90	0.84	0.74	0.66
Exp. 2	1.00	0.94	0.78	0.64	0.56	Exp. 4	1.00	0.86	0.72	0.66	0.58

; Each value represents relative ratio of TNF- $\alpha$  mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

Table 2. TGF- $\beta$ 1 Expression Level in Kupffer Cells after IJCGT Treatment

	Control	IJCGT treated ( $\mu\text{g/ml}$ ; 48hrs)				Control	IJCGT treated (hrs; 10 $\mu\text{g/ml}$ )				
		1	10	50	100		12	24	48	72	
Exp. 1	1.00	0.92	0.62	0.42	0.38	Exp. 3	1.00	0.84	0.70	0.60	0.32
Exp. 2	1.00	0.94	0.64	0.40	0.32	Exp. 4	1.00	0.88	0.66	0.58	0.40

; Each value represents relative ratio of TGF- $\beta$ 1 mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

Table 3. IL-1 $\beta$  Expression Level in Kupffer Cells after IJCGT Treatment

	Control	IJCGT treated ( $\mu\text{g/ml}$ ; 48hrs)				Control	IJCGT treated (hrs; 10 $\mu\text{g/ml}$ )				
		1	10	50	100		12	24	48	72	
Exp. 1	1.00	1.02	0.94	0.86	0.78	Exp. 3	1.00	0.96	0.90	0.86	0.74
Exp. 2	1.00	0.98	0.92	0.80	0.72	Exp. 4	1.00	0.92	0.86	0.82	0.76

; Each value represents relative ratio of IL-1 $\beta$  mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

5. 茵陳清肝湯이 kupffer cell의 IL-8 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 kupffer cell에서 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여, kupffer cell ( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을 각각 1, 10, 50,  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 48시간 처리하고,  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 각각 12, 24, 48, 72시간 처리하였다. 대조군에는 茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 처리가 끝난 다음에는 quantitative RT-PCR을 통해 target gene들에서 발현된 mRNA 양을 측정하였다. 그 결과, 茵陳清肝湯의 처리 농도와 처리 시간에 비례하여 kupffer cell의 IL-8의 mRNA 발현량이 감소하였다 (Table 5).

6. 茵陳清肝湯이 ethanol에 의해 유도되는 cytokine 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 ethanol에 의해 유도되는 inflammatory cytokine mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell ( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 투여하고 6시간이 지난 후, 각각 ethanol 0, 1, 10, 50mM을 투여하였다. 대조군에는 茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 24시간이 경과한 다음 quantitative RT-PCR을 통해 target gene들에서 발현된 mRNA 양을 측정하였다. 그 결과, ethanol에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine gene(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)의 mRNA 발현량이 茵陳清肝湯에 의해

Table 4. IL-6 Expression Level in Kupffer Cells after IJCGT Treatment

	Control	IJCGT treated ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 48hrs)				Control	IJCGT treated (hrs; $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )				
		1	10	50	100		12	24	48	72	
Exp. 1	1.00	0.86	0.74	0.66	0.50	Exp. 3	1.00	0.90	0.78	0.70	0.52
Exp. 2	1.00	0.92	0.76	0.68	0.54	Exp. 4	1.00	0.84	0.72	0.68	0.46

; Each value represents relative ratio of IL-6 mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

Table 5. IL-8 Expression Level in Kupffer Cells after IJCGT Treatment

	Control	IJCGT treated ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 48hrs)				Control	IJCGT treated (hrs; $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )				
		1	10	50	100		12	24	48	72	
Exp. 1	1.00	0.96	0.90	0.78	0.62	Exp. 3	1.00	0.96	0.88	0.80	0.56
Exp. 2	1.00	0.94	0.88	0.72	0.58	Exp. 4	1.00	0.96	0.90	0.88	0.60

; Each value represents relative ratio of IL-8 mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

Table 6. Effect of IJCGT on Ethanol Induced Inflammatory Cytokine Gene Expression in Kupffer Cells

Ethanol(mM, 24hrs)	- IJCGT ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )				+ IJCGT ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )			
	0	1	10	50	0	1	10	50
TNF- $\alpha$	1.00	1.64	2.26	3.68	0.92	1.26	1.58	1.42
TGF- $\beta$ 1	1.00	1.46	1.96	2.25	0.88	1.18	1.26	1.22
IL-1 $\beta$	1.00	1.26	1.68	2.06	0.92	1.02	1.22	1.62
IL-6	1.00	1.32	1.60	2.04	0.86	1.14	1.28	1.72
IL-8	1.00	1.28	1.56	1.98	0.90	1.04	1.24	1.52

; Each value represents relative ratio of each gene mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

감소하였다(Table 6).

7. 茵陳清肝湯이 acetaldehyde에 의해 유도되는 cytokine 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 acetaldehyde에 의해 유도되는 inflammatory cytokine mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을  $10 \mu\text{g/ml}$  농도로 투여하고 6시간이 지난 후, 각각 acetaldehyde 0, 100, 200,  $400 \mu\text{M}$ 을 투여하였다. 대조군에는 茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 24시간이 경과한 다음 quantitative RT-PCR을 통해 target gene들에서 발현된 mRNA량을 측정하였다. 그 결과, acetaldehyde에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine gene(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)의 mRNA 발현량이 茵陳清肝湯에 의해 감소하였다(Table 7).

8. 茵陳清肝湯이 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 cytokine 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 inflammatory cytokine mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을  $10 \mu\text{g/ml}$  농도로 투여하고 6시간이 지난 후, 각각 lipopolysaccharide 0, 1, 5,  $10 \mu\text{M}$ 을 투여하였다. 대조군에는 茵陳清肝湯을 투여하지 않았다. 24시간이 경과한 다음 quantitative RT-PCR을 통해 target gene들에서 발현된 mRNA량을 측정하였다. 그 결과, lipopolysaccharide에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine gene(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)의 mRNA 발현량이 茵陳清肝湯에 의해 감소하였다(Table 8).

Table 7. Effect of IJCGT on Acetaldehyde Induced Inflammatory Cytokine Gene Expression in Kupffer Cells

Acetaldehyde( $\mu\text{M}$ , 24hrs)	- IJCGT ( $10 \mu\text{g/ml}$ )				+ IJCGT ( $10 \mu\text{g/ml}$ )			
	0	100	200	400	0	100	200	400
TNF- $\alpha$	1.00	1.72	2.32	3.72	0.94	1.24	1.48	1.62
TGF- $\beta$ 1	1.00	1.60	2.06	2.54	0.82	1.16	1.32	1.34
IL-1 $\beta$	1.00	1.32	1.98	2.18	0.94	1.08	1.36	1.68
IL-6	1.00	1.38	1.74	2.32	0.80	1.18	1.40	1.70
IL-8	1.00	1.42	1.60	2.12	0.86	1.12	1.28	1.62

; Each value represents relative ratio of each gene mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

Table 8. Effect of IJCGT on Lipopolysaccharide Induced Inflammatory Cytokine Gene Expression in Kupffer Cells

LPS( $\mu\text{M}$ , 24hrs)	- IJCGT ( $10 \mu\text{g/ml}$ )				+ IJCGT ( $10 \mu\text{g/ml}$ )			
	0	1	5	10	0	1	5	10
TNF- $\alpha$	1.00	1.64	1.92	2.34	1.04	1.22	1.34	1.46
TGF- $\beta$ 1	1.00	1.42	1.90	2.22	0.94	1.16	1.22	1.38
IL-1 $\beta$	1.00	1.72	2.04	2.46	0.92	1.48	1.82	1.80
IL-6	1.00	1.66	1.94	2.12	1.02	1.20	1.44	1.60
IL-8	1.00	1.48	1.76	2.26	1.06	1.24	1.36	1.76

; Each value represents relative ratio of each gene mRNA/GAPDH mRNA when that of the control is set to 1.00.

9. 茵陳清肝湯이 ethanol에 의한 kupffer cell의 cytokine 단백 생성에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 ethanol에 의해 유도되는 inflammatory cytokine 단백 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을 각각 0, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 투여하고 6시간이 지난 후, ethanol 50mM을 투여하였다. 대조군에는 ethanol을 투여하지 않았다. 24시간이 경과한 다음 ELISA system을 이용하여 각 cytokine 단백 생성량을 측정하였다. 그 결과, ethanol에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine 단백 생성량이 茵陳清肝湯에 의해 감소하였다. 특히, TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 1에서 현저하게 감소하였다(Table 9).

10. 茵陳清肝湯이 acetaldehyde에 의한 kupffer cell의 cytokine 단백질 생성에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 acetaldehyde에 의해 유도되는 inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝

湯을 각각 0, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 투여하고 6시간이 지난 후, acetaldehyde 200  $\mu\text{M}$ 을 투여하였다. 대조군에는 acetaldehyde를 투여하지 않았다. 24시간이 경과한 다음 ELISA system을 이용하여 각 cytokine 단백 생성량을 측정하였다. 그 결과, acetaldehyde에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine 단백 생성량이 茵陳清肝湯에 의해 감소하였다. 특히, TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 1에서 현저하게 감소하였다(Table 10).

11. 茵陳清肝湯이 LPS에 의한 kupffer cell의 cytokine 단백질 생성에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell( $1 \times 10^5$  cells/well)에 茵陳清肝湯을 각각 0, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 투여하고 6시간이 지난 후, lipopolysaccharide를 10  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였다. 대조군에는 lipopolysaccharide를 투여하지 않았다. 24시간이 경과한 다음 ELISA system을 이용하여 각 cytokine 단백 생성량을 측정

Table 9. Effect of IJCGT on Ethanol Induced Inflammatory Cytokine Secretion in Kupffer Cells

IJCGT( $\mu\text{g/ml}$ )	Ethanol untreated		Ethanol treated (50 mM; 24 hrs)			
	0	0	1	10	50	100
TNF- $\alpha$	202	462	402	316	264	224
TGF- $\beta$ 1	106	188	142	114	102	104
IL-1 $\beta$	204	368	356	326	294	278
IL-6	182	362	352	324	290	276
IL-8	212	316	292	284	262	254

Table 10. Effect of IJCGT on Acetaldehyde Induced Inflammatory Cytokine Secretion in Kupffer Cells

HJCGT( $\mu\text{g/ml}$ )	Acetaldehyde untreated		Acetaldehyde treated (200 $\mu\text{M}$ ; 24 hrs)			
	0	0	1	10	50	100
TNF- $\alpha$	210	458	412	324	278	232
TGF- $\beta$ 1	114	204	182	142	118	118
IL-1 $\beta$	196	372	344	332	310	288
IL-6	196	382	356	338	322	294
IL-8	192	322	312	282	270	258



Table 11. Effect of IJCGT on Lipopolysaccharide Induced Inflammatory Cytokine Secretion in Kupffer Cells

IJCGT( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )	LPS untreated		LPS treated ( $10\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ; 24 hrs)			
	0	0	1	10	50	100
TNF- $\alpha$	194	462	392	322	258	216
TGF- $\beta$ 1	114	226	198	152	118	112
IL-1 $\beta$	194	442	438	418	382	342
IL-6	196	414	390	372	342	308
IL-8	206	394	382	344	316	282

하였다. 그 결과, lipopolysaccharide에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine 단백질 생성량이茵陳清肝湯에 의해 감소하였다. 특히, TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 1에서 현저하게 감소하였다(Table 11).

#### IV. 考 察

알코올성 간질환이 만성 간질환의 가장 큰 비중을 차지하는 구미 지역의 경우와는 달리, 우리나라에서는 만성 간질환의 45-73%가 B형 간염 바이러스와 연관되고 15-48%가 C형 간염 바이러스와 관련되어, 여전히 바이러스성 간염이 큰 비중을 차지하고 있다. 최근 십여년간 꾸준히 B형 간염의 예방 정책이 시행되면서 B형 간염 바이러스 보유율은 다소 감소하고 있으나, C형 간염 바이러스 보유율은 점차 증가하고 있으며, 습관성 음주자의 증가로 인해 알코올성 간질환 환자 역시 증가하고 있다<sup>1-3</sup>. 간질환은 최근 우리나라의 사망원인별 사망순위에서는 5위를 차지하고 있고, 특히 40대 남자에서는 악성신생물 다음으로 2위를 차지하고 있어<sup>4</sup>, 개인은 물론 사회적으로도 중요한 문제가 되고 있다.

간손상의 원인은 바이러스, 약물, 알코올 등으로 다양하지만 염증 및 섬유화 과정에 있어서 liver macrophage인 kupffer cell의 역할은 대동소이하다<sup>10-12</sup>. 각종 간질환에 있어 kupffer cell이 활성화되면 inflammatory cytokine 뿐만 아니라 eicosanoids, free radical 등의 분비가 증가한다. Kupffer cell은 일차적으로 IL-1, TNF- $\alpha$  등의 cytokines을 분비시키

고, kupffer cell에서 분비된 IL-1, TNF- $\alpha$ 는 이차적으로 IL-6, IL-8 등을 분비시켜 염증 및 섬유화 과정을 진행시킨다<sup>14</sup>.

본 실험에서 관찰한 TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8은 각종 간질환에서 kupffer cell에서 분비되어 liver parenchymal cell들의 apoptosis를 유발하고, reactive oxygen species(ROS)나 reactive nitrogen species(RNS)의 분비를 야기하는 등 염증반응을 유발한다<sup>15-17</sup>. 특히 IL-8과 TNF- $\alpha$ 는 예후와 관련을 보인다. TNF- $\alpha$ 는 일차적으로 kupffer cell에서 유래하여, 간세포에 직접적인 cytotoxic effect를 보이거나 간세포가 IL-8을 생성하도록 자극하여 간접적으로 간손상을 줄 수 있다. 간조직의 TNF- $\alpha$  mRNA의 양은 간세포의 피사나 염증의 초기 변화와 관련성을 보인다. TNF- $\alpha$ 는 백혈구가 sinusoid endothelium에 adhesion되는 것을 촉진하고, superoxide와 toxic proteinase의 분비를 자극하여 간손상을 가속화시킬 수 있다<sup>18</sup>. TGF- $\beta$ 1은 hepatic stellate cell의 활성화를 유도하여 alpha1 collagen 생산을 야기함으로써 hepatic fibrosis에 관여한다<sup>17</sup>. 강력한 chemoattractant이며 neutrophil stimulator인 IL-8은 알코올성 간염 환자의 간에서 발견되었으며, 간의 IL-8은 neutrophil이 간실질로 이동하는데 관여한다. IL-8의 유전자 발현은 oxidative stress와 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된다<sup>18</sup>.

韓醫學 文獻에 나타난 肝臟疾患은 黃疸, 積聚, 脹滿, 酒傷, 勞倦傷, 脇痛 等の 證候에 收錄되어 왔다. 이 중 黃疸과 脹滿, 특히 黃疸의 證候는 많은 부분

에서 급·慢性 바이러스성 肝炎, 肝硬變症과 관련되어 있으며, 肝臟疾患이 重症으로 進行함에 따라 나타나는 經過와 豫後에 관한 內容도 상당히 收錄되어 있다. B.C. 3C경에 저술된 『黃帝內經』에 나타난 黃疸의 發生機序는 脾所生病과 肝傳之脾病 및 腎所生病으로 기술하고 있다. 『素問·經脈篇』에서 “脾不能制水 水閉黃疸”이라 하였고, 『玉機眞藏論』에서 肝傳之脾病은 脾風인데 虛勞를 말하고 腹中熱하며 煩心하고 黃疸이 나타난다고 하였으며, 『經脈篇』에 收載된 腎所生病에 대해 註에서 陰虛陽實하여 발생한 것이라고 하였다. A.D. 2C경의 張仲景은 『傷寒論』에서 黃疸의 病因病理를 瘀熱在裏, 寒濕在裏 및 蓄血이라 하였는데 이후부터 현재까지 한의학에서는 이 理論에 根據하여 黃疸 또는 바이러스성 肝炎을 관찰하여 왔다. 瘀熱在裏에 의한 황달을 다스리는 處方으로는 茵陳五苓散, 茵陳蒿湯, 梔子蘗皮湯, 梔子大黃湯, 茵陳三物湯 등이 있다. 또한 寒濕在裏에 의한 황달을 다스리는 처방으로는 加減苓朮湯이 대표적이다<sup>19</sup>.

본 實驗에 사용된 茵陳清肝湯은 茵陳四苓散에 地榆 覆盆子 蘿菴子 青皮 砂仁을 加味한 方劑이며 現在 臨床에서 清熱利濕을 日標로 急慢性肝疾患에 頻繁히 投與되고 있는 處方이다<sup>5</sup>. 處方內容 중의 茵陳<sup>20</sup>은 味苦 性平微寒하여 脾胃肝膽經으로 歸經하는데, 除脾胃濕熱鬱結 發汗利水 傷寒時疾狂熱 瘴瘧頭痛頭旋 女人瘦疝 清熱利濕 退黃疸하는 작용이 있어서 濕熱로 인한 黃疸, 寒濕으로 인한 黃疸, 清熱의 목적으로 사용이 가능하다. 地榆<sup>20</sup>는 味苦酸 性微寒하고 肝大腸經으로 歸經하며 清熱收斂 下焦血證濕熱하여, 治吐衄崩中 腸風血痢 療金瘡 涼血止血 瀉火斂瘡하는 작용이 있고, 覆盆子<sup>20</sup>는 味甘酸 性微溫하며 肝腎經으로 歸經하는데 補益肝腎 固精縮尿하여 強壯 收斂 抗利尿作用 治陽痿縮小便 續絕傷 美顏色 烏鬚髮 女子多孕하는 작용이 있으며, 또한 地榆와 覆盆子は HBeAg의 발현량을 감소시키는 항바이러스 작용이 있는 것으로 알려져 있다<sup>21</sup>. 白朮<sup>20</sup>은 味甘微苦 性溫微香하며, 脾胃經에 歸經하여 補脾和中 燥濕 補氣補血 無汗能發 有汗能止하는데, 補脾하여

進飲食 祛勞倦 止肌熱 化癥癖하며, 和中하여 止嘔吐 定痛安胎하며, 燥濕하여 利小便 生津液 止泄瀉 心下急滿 利腰臍血結 祛周身濕痛 補脾燥濕 利水 止汗하는 작용이 있다. 猪苓<sup>20</sup>은 味甘淡 性平하고, 腎膀胱經에 歸經하는데, 利水滲濕 清熱 泄滯利竅 開腠發汗 利濕行水하여 傷寒瘟疫大熱 懊膿消渴 腫脹淋濁 瀉痢疼痛 등에 活用된다. 白茯苓<sup>20</sup>은 味甘 性平하고, 心肺脾胃腎經으로 歸經하며 益脾寧心 利竅除濕 色白入肺瀉熱 而下通膀胱하여, 治憂志驚悸 心下結痛 寒熱煩滿 口焦舌乾 咳逆嘔噦 胸中痰水 水腫淋瀝 泄瀉遺精 小便結者能通 多者能止 生津止渴 利水滲濕 健脾和中 寧心安神하는 작용이 있다. 澤瀉<sup>20</sup>는 味甘 性寒하고 腎膀胱經에 歸經한다. 利水瀉火하여 消渴 痰飲 嘔吐瀉痢 腫脹水痞 脚氣疝痛 淋瀝陰汗 尿血泄精 등에 사용되며, 一切濕熱之病에 利水 滲濕 泄熱 或 清熱하는 목적으로 活用된다. 蘿菴子<sup>20</sup>는 味辛甘 性平하며 胃肺經으로 歸經하는데, 下氣散結 寬中消食 化痰散瘀하여, 治吐衄 咳嗽吞酸 利小便 解酒毒 制麵毒 豆腐毒 消食化積 祛痰下氣 健胃祛痰하는 작용이 있다. 青皮<sup>20</sup>는 味苦辛 性溫하며 肝膽經으로 歸經하는데, 通肝瀉肺 散積消痞 除痰開竅開滯하여, 治肝氣鬱積 脇痛多怒 久瘡結癖 胸膈逆氣 疝痛乳腫 疏肝破氣 散積化滯하는 작용이 있다. 砂仁<sup>20</sup>은 味辛 性溫하며 脾胃腎經으로 歸經하는데 和胃醒脾 快氣 調中 通行結滯 化濕醒脾 行氣寬中 安胎하여, 治腹痛 痞脹 霍亂轉筋 噎膈嘔吐 上氣咳嗽 賁豚崩帶 赤白瀉痢 祛痰逐冷 消食醒酒 止痛安胎 咽喉口齒瀉熱하는 작용이 있다. 甘草<sup>20</sup>는 味甘性平하며 肝脾經 및 其他 모든 經脈에 歸經하고, 補脾胃不足 瀉心火 補三焦原氣 散表寒 能協和諸藥 通行十二經 諸腫瘡瘍 解百藥毒하여 脾胃虛弱 및 氣血不足 咳嗽氣喘 瘡瘍腫毒 咽喉腫痛 腹中掣急作痛 등을 완화하는 작용이 있다.

茵陳清肝湯에 대한 기존의 연구로는, 金<sup>7</sup>은 임상용량으로 경구투여시 부작용을 일으키지 않음을 확인하여 그 안전성을 검증하였고, 禹<sup>5</sup>가 慢性 B型 肝炎 환자에 대한 임상연구를 통하여 혈청학적 검사상 AST, ALT 등의 간기능 개선과 HBeAg의 음전

에 대한 유의한 효과가 있음을 보고하였다. 또한, 金<sup>8</sup>은茵陳清肝湯이 전격성 간염을 일으킨 마우스의 생존률을 높이는 효과가 있음을 보고하였고, 또한 姜<sup>9</sup>은茵陳清肝湯加味方이 MHV-2M 및 水浸스트레스로 실험적 肝硬變症을 유발한 마우스에 대하여 간기능개선, 간보호, 간손상회복, 재생에 유의한 효과가 있어 慢性肝炎이 肝硬變症으로 이행되는 것을 억제함을 보고하였다.

최근에는茵陳清肝湯의 효능을 분자생물학적인 접근을 통해 검증하려는 연구가 시도되었으며, 이러한 연구 보고로 朴<sup>22</sup>은茵陳清肝湯加味方이 apoptosis와 연관되는 Bcl-2, Bcl-XL 활성을 높여 apoptosis를 억제한다고 보고하였고, 洪<sup>23</sup>은茵陳清肝湯加味方이 etoposide에 손상된 간세포를 보호하고 Cpp32 protease를 억제하였으며 Cpp32, Fas를 억제하고 Bcl-2와 Bcl-XL을 촉진시킨다고 보고하였으며, 表<sup>24</sup>는茵陳清肝湯의 根幹을 이루는茵陳四苓散이 Cpp32 protease를 감소시키고 Fas, Cpp32를 억제하며 Bcl-2와 Bcl-XL을 촉진시킨다고 보고하였고, 李<sup>25</sup>는茵陳의 분획물 중 butanol fraction에서 Fas를 매개로 하는 apoptosis에 대해 간세포 보호 효과가 가장 높다고 하였다. 高<sup>26</sup>는茵陳四苓散의 각 분획은 HepG2 cell에서 간세포활성을 높이고 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포 손상을 억제하는 것으로 나타났으며 butanol 분획물에서 가장 현저한 것으로 보고하였고, 李<sup>27</sup>는茵陳의 butanol fraction이 간세포의 TGF-β1 induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 간기능을 보호하는 것으로 보고하였으며, 愼<sup>28</sup>은茵陳이 간세포를 대상으로는 TGF-β1 합성을 억제하였고 fibroblast를 대상으로는 세포증식과 섬유화 유발 유전자의 발현을 억제함을 관찰하였다. 이러한 연구를 통해 각종 肝疾患에茵陳清肝湯을 다양하게 사용할 수 있는 근거가 마련되었다.

본 실험에서는茵陳清肝湯의 효능을 보다 구체적으로 검증하기 위해,茵陳清肝湯이 염증 및 섬유화 반응을 매개하는 kupffer cell의 inflammatory cytokines 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

茵陳清肝湯이 kupffer cell에서 inflammatory cytokine의 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여, kupffer cell에茵陳清肝湯을 처리 농도(1, 10, 50, 100 $\mu$ g/ml)와 처리 시간(12, 24, 48, 72시간)을 달리하며 처리한 후, quantitative RT-PCR을 통해 target genes(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)에서 발현된 mRNA 량을 측정하였으며, 그 결과,茵陳清肝湯의 처리 농도와 처리 시간에 비례하여 inflammatory cytokine mRNA의 발현량이 감소됨이 관찰되었다(Table 1~5).

茵陳清肝湯이 ethanol, ethanol의 대사산물인 acetaldehyde, endotoxin인 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 inflammatory cytokine mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell에茵陳清肝湯(10 $\mu$ g/ml)을 전 처리하고 6시간이 지난 후, ethanol(0, 1, 10, 50mM), acetaldehyde(0, 100, 200, 400 $\mu$ M), lipopolysaccharide(0, 1, 5, 10 $\mu$ M)을 투여하였다. 24시간이 경과한 다음 quantitative RT-PCR을 통해 target genes(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)의 mRNA 발현량을 측정하였으며, 그 결과 ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine genes의 mRNA 발현량이茵陳清肝湯에 의해 감소하였다(Table 6~8).

茵陳清肝湯이 ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide에 의해 유도되는 inflammatory cytokine 단백질 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 kupffer cell에茵陳清肝湯(0, 1, 10, 50, 100 $\mu$ g/ml)을 투여하고 6시간이 지난 후, ethanol(50mM), acetaldehyde(200 $\mu$ M), lipopolysaccharide (10 $\mu$ g/ml)을 처리하였다. 24시간이 경과한 다음 ELISA system을 이용하여 각 cytokine 단백질 생성량을 측정하였으며, ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide에 의해 증가하는 kupffer cell의 모든 inflammatory cytokine 단백질 생성량이茵陳清肝湯에 의해 감소하였고, 특히, TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 1의 감소가 현저하였다(Table 9~11).

이상에서茵陳清肝湯은 간질환에 있어서 kupffer cell에서 발현되는 각종 inflammatory cytokine 생성

을 억제하는 작용이 있는 것으로 관찰되었으며, 특히 TNF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 1에서 현저하였다. 이러한 작용은 inflammatory cytokine gene의 발현에 있어서 mRNA가 transcription되는 과정에서부터 억제 작용을 나타내는 것으로 추정되며, 이와 관련해서는 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

茵陳清肝湯이 kupffer cell의 inflammatory cytokines 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여,茵陳清肝湯을 전 처리한 kupffer cell에 ethanol, acetaldehyde, endotoxin(lipopolysaccharide)을 투여한 다음, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 mRNA 및 각 cytokine의 protein 발현 정도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1.茵陳清肝湯은 kupffer cell의 inflammatory cytokine genes(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)의 mRNA 발현을 처리 농도 및 시간에 의존적으로 억제하였으며, 특히 TGF- $\beta$ 1에서 현저하였다.
2. Ethanol, acetaldehyde, LPS는 inflammatory cytokine genes(TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8)의 발현을 증가시켰으며,茵陳清肝湯은 이들 inflammatory cytokine genes 모두를 농도 및 시간 의존적으로 억제시켰다.
3. Ethanol, acetaldehyde, LPS는 inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) protein secretion을 증가시켰으며茵陳清肝湯은 이들 cytokine secretion을 농도 및 시간 의존적으로 억제시켰다. 특히 TNF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ 1에서 현저하였다.

이상에서茵陳清肝湯은 liver inflammation, fibrosis 등의 간질환 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려진 kupffer cell에서의 inflammatory cytokine 발현을 억제함으로써 간세포에 대한 보호작용을 나타내는 것으로 추론된다. 특히 ethanol, acetaldehyde, LPS에 의해 촉발되는

inflammatory cytokine 유전자의 mRNA 발현과 이들 cytokine의 protein secretion을 억제함이 확인됨으로서 alcohol 및 infectious liver injury로부터의 간세포 보호작용을 나타내는 것으로 판단된다.

## 參考文獻

1. 주광로, 방성조, 송병철, 윤광희, 주연호, 양수현, 김기락, 정영화, 이영상, 서동진. 1990년대 후반 한국 성인의 B형 간염 바이러스 표지자 보유양상. 대한소화기학회지 1999;33:642-52.
2. 한요셉, 김병호, 백일현, 이동근, 김경진, 동석호, 김효중. 1990년대 간경변증의 원인, 합병증, 사망원인의 변화에 관한 고찰. 대한간학회지 2000;6:328-39.
3. 변관수. 알코올성 간질환의 임상 및 병리학적 측면. 대한간학회지 1997;3:307-15.
4. 통계청. 2002년 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2003, p.10, 11, 26.
5. 우홍정. 만성B형간염에 대한 인진청간당의 효과. 제2회한중학술대회참가논문집 1995:18-53.
6. 장중경. 금궤요략. 서울: 행림서원; 1984, pp.392-4.
7. 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당의 안전성에 관한 연구. 경희한의대논문집 1997;20:57-89.
8. 김진주. 인진청간당이 MHV-2로 유발된 마우스의 손상간에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 1996.
9. 강경태, 이장훈, 우홍정. 인진청간당가미방이 실험적 흰쥐의 간경변증에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1997;20:133-50.
10. Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003;10(3):159-67.
11. Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzon C, Garcia-

- Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E, Pivel JP, Lopez-Cabrera M, Fernandez-Ruiz E, Sanchez-Madrid F. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994;179: 841-8.
12. Thurman RG, Bradford BU, Iimuro Y, Knecht KT, Connor HD, Adachi Y, Wall C, Arteel GE, Raleigh JA, Forman DT, Mason RP. Role of Kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: studies in female and male rats. *J Nutr* 1997;127(suppl5):903S-6S.
13. 지형준 외. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998, p.65, 142, 274, 286, 287, 310, 501, 522, 561, 590, 610.
14. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990;11:599-605.
15. Kamimura S, Tsukamoto H. Cytokine gene expression by kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 1995;22: 1304-9.
16. Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002;27:63-8.
17. Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochem J* 2002;368:683-93.
18. 권상욱. 알코올성 간질환의 치료. 대한간학회지 2001;7(suppl1):71-8.
19. 전국한의과대학 간계내과학교수 공저. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001, pp.256-260.
20. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울: 영림사; 1995, pp.294-6, 302-6, 328, 349-50, 373-4, 536-7, 540-1, 630-1.
21. 우홍정, 이장훈, 김영철. 수종의 한약제가 HepG 2.2.15 cell의 HBeAg발현 억제에 미치는 효과. 대한한방내과학회지 1999;20:122-32.
22. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕가미방이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한학회지 1998;19:145-64.
23. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕가미방이 간세포활성세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한학회지 1998;19:337-72.
24. 표임정, 이장훈, 우홍정. 인진사령산이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1999;22:119-40.
25. Yi JH, Lee JH, Woo HJ. Effects of Five Fraction of Artemisia Capillaris THUMB on Fas-mediated Apoptosis in HepG2 Cells. *Journal of Oriental Medicine* 1999;4:41-5.
26. 고흥, 이장훈, 우홍정. 인진사령산 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-Mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한학회지 2000;21: 174-85.
27. 이지현, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 인체간세포의 TGF-β1 induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한학회지 2000;20:53-61.
28. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진이 TGF-B1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한학회지 2001;22:141-55.