

淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NFκB 활성화 및 세포사멸에 미치는 영향

한창우, 김영철, 이상훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of *Chungganhaeju-tang*(*Qingganjiejiu-tang*) on NFκB Activation and Apoptosis of Kupffer Cells

Chang-Woo Han, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

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

Objectives : Previous studies showed that treatment with *Chungganhaeju-tang* prevents hepatic inflammation and apoptosis in alcoholic liver disease. The purpose of our study is to determine if any relations exists between the transcription factor NFκB, an orchestrating expression of a large number of genes and inhibitory effects of *Chungganhaeju-tang* on ethanol induced apoptosis.

Materials and Methods : To assess the role of NFκB, we blocked NFκB activation by delivering to the kupffer cells IkBAN, a dominant negative NFκB inhibitor, and investigated if *Chungganhaeju-tang* still prevented apoptosis.

Results : When NFκB activation was blocked, there was no inhibitory effect of *Chungganhaeju-tang* on ethanol induced apoptosis of kupffer cells.

Conclusion : This result suggests that *Chungganhaeju-tang* protects the liver from ethanol induced apoptosis by activating the NFκB that plays a key role in porotecting mechanism and reducing inflammatory cytokine gene expression.

Key Words: *Chungganhaeju-tang*(*Qingganjiejiu-tang*), kupffer cell, apoptosis, NFκB

1. 緒 論

우리나라에서는 바이러스성 간염이 만성 간질환의 주된 원인이지만, 근래에는 습관성 음주자가 점차로 증가하면서 알코올성 간질환 환자는 계속 증가하여, 알코올성 간질환이 전체 만성 간질환의 약 20%에 이르고 있고, 1990년대에는 우리나라 간경변증의 원인으로 알코올성 간경변증이 30-38%를 차지할 정도로 증가하고 있다. 따라서,

앞으로 우리나라도 구미와 같이 알코올성 간질환이 전체 간질환의 주종을 이루는 시기가 올 것으로 생각된다¹⁻³.

최근 알코올성 간질환의 발생기전에 관한 분자 및 세포생물학적 연구들이 진행됨에 따라 새로운 병리기전들이 밝혀지고 있고, 그 기전에 이론적 배경을 둔 다양한 치료법들이 시도되고 있다. S-adenosylmethionine(SAME), polyenylphosphatidylcholine(PPC) 등을 이용하여 알코올성 간질환에서 발생하는 영양소의 결핍을 교정하거나, CYP2E1을 억제하여 free radical 형성을 저해하기도 하고, 유전자 치료나 항산화제를 이용하여 산화적 스트레스를 감소시키거나, 항사이토카인 치료를

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

통해 염증을 억제하기도 하고, apoptosis를 억제시키는 다양한 방법에 대해서도 연구가 진행되고 있다⁴. 그러나, 알코올성 간질환의 치료는 여전히 근본적인 치료 방법을 찾지 못한 채 보존적 처치에 한정되어 있어^{5,6}, 효과적인 치료제 개발이 시급한 실정이다.

淸肝解酒湯은 濕痰을 제거하는 對金飮子에 淸熱利濕하는 茵陳四苓散을 合方하고 酒毒에 사용되는 葛根, 赤楊 등을 가미하여 구성된 처방이다⁷. 淸肝解酒湯은 알코올성 간질환에서 생화학적 지표를 정상화시키고⁷, 임상 증상을 개선시키는 것이 확인되었고⁸, 알코올 및 그 대사산물에 의한 간세포의 apoptosis를 억제시킴으로써 우수한 간보호 작용을 나타내는 것으로 확인된 바 있다⁹.

이에 저자는 淸肝解酒湯이 apoptosis를 억제시키는 기전을 규명하기 위하여, 여러 가지 유전자들의 발현을 조절함으로써 다양한 생리·병리적 반응을 매개하는 주요한 전사(transcription) 조절자로 알려진 NFκB¹⁰의 활성화에 대한 淸肝解酒湯의 영향을 조사하였고, ethanol 및 acetaldehyde-induced apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 억제효과가 NFκB 활성화에 의해 매개되는지를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹¹에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 아래 표와 같다.

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 淸肝解酒湯 1첩 분량(118g)을 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. 얻어진 추출물을 DMEM 배지 110 ml에 더하여 37℃에서 3시간 동안 섞었다. 원심분리하여 남아있는 시료를 제거한 상층액을 0.45μm 필터(Millipore사)로 여과하여 멸균하고 4℃에 저장하였다.

2. 방법

1) Kupffer cell의 분리 및 배양

Kupffer cell은 건강한 male Wistar rat

Prescription of Chungganhaeju-tang

韓藥名	生藥名	Dose
茵 陳	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	Poria	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

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

2) 검액의 처리

우선 淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NF κ B 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 kupffer cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 0.05%의 bovine albumin이 포함된 RPMI1640로 배양한 후 淸肝解酒湯을 처리 농도(0, 1, 10, 100 μ g/ml의 농도로 24hrs)와 처리 시간(10 μ g/ml의 농도로 0, 2, 6, 12, 24hrs)을 달리하면서 투여하였다. Ethanol, acetaldehyde에 의한 apoptosis와 NF κ B 활성화와의 관련성을 분석하기 위하여 ethanol (1, 10, 50mM), acetaldehyde (100, 200, 400 μ M) 투여 6시간 전에 淸肝解酒湯을 투여하였다. 淸肝解酒湯을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포(대조군)를 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°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 μ l, 2M sodium acetate(pH4.0) 50 μ l를 넣어

잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500 μ l, chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 100 μ l를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

- ③ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000 μ l를 넣어 -70°C에서 24시간 침전시켰다.
- ④ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA pellete을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30 μ l의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

(2) cDNA의 제작

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

(3) Primer

House keeping gene인 GAPDH(Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase)와 target genes인 I κ B, IKK β , MKK4, MKK6, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8의 primers를 사용하였다.

(4) Quantitative RT-PCR

- ① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다 ; 10 \times amplification buffer 10 μ l, Mixture of dNTP (10pM) 5 μ l, primer1 (sense 10pM) 2 μ l, primer2 (antisense 10pM) 2 μ l, Template cDNA 4 μ l, H $_2$ O 77 μ l
- ② 상기한 mRNA-specific primer를 이용하여 아래의 조건으로 34-40cycle의 PCR 반응을 시행하였다.
 - a. First cycle : Denaturation (5min at 94°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'-TGA CTGTCCGATTGTCAATCCAGGCT-3'
	Antisense	5'-GACATGGATCCCACGAAATCTAGCGAC-3'
NFκB	Sense	5'-AAGTCGATCGAGATCGATGGTGTGCC-3'
	Antisense	5'-AGAGTCGGTGCTGAATGACGCCGCAT-3'
IκB	Sense	5'-CCAGGGCAATCTTACAGATCTCGATAGG-3'
	Antisense	5'-AGAGTCGGTGCTGAATGACGCCGCAT-3'
IKKβ	Sense	5'-AGGGATCGATCGGTATATAGCTAGGCT-3'
	Antisense	5'-GGGTTATATCGATCGCTAGGAGGGAG-3'
MKK6	Sense	5'-GGATTTGATTTAGACACCACTAGGATC-3'
	Antisense	5'-GAGATCTCTCTGGACCTGTAGTCGGCAA-3'
MKK4	Sense	5'-TATAGTGATCGGGA ACTAATCGAGTGAT-3'
	Antisense	5'-ACATCTCTGATTGGCTAGTTGTCAACCA-3'
TNF-α	Sense	5'-GATCCAGCGACTGCATCGAGATCCTC-3'
	Antisense	5'-TGCCTAGTTGACAATCGAATGCCGCT-3'
IL-1β	Sense	5'-GACAGCTAAGAGAGCTTTGACGCCTC-3'
	Antisense	5'-AACGACTGATTGGGACACTACAGAGAG-3'
IL-6	Sense	5'-TTATCACGACAGCTAGAGTCGGGCGCT-3'
	Antisense	5'-CGCGGGCATCTATCATCTATTCGACGG-3'
IL-8	Sense	5'-AATACAGAGCGCTGCTGATCGATCGCGC-3'
	Antisense	5'-AGAGCGGTCACACTGCGACGTATAGCT-3'

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

b. Subsequent cycles (32-38cycles) : Denaturation (1min at 94°C), Annealing (1min at 59°C), Polymerization (1min at 72°C)

c. Last cycle : Denaturation (1min at 94°C), Annealing (1min at 59°C), Polymerization (10min at 72°C)

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

4) NFκB 활성화 분석을 위한 세포질과 핵질의 분리

배양세포는 ice-cold phosphate-buffered saline으로 2회 세척한 후 rubber policeman을 이용하여 회수하였다. 회수된 세포를 6,000×g로 약 1분간 원심하였으며 100μl의 low salt buffer (20mM HEPES,

pH7.9, 10mM KCl, 0.1mM NaVO₄, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.2% Nonidet P-40, 10% glycerol, supplemented with a set of proteinase inhibitors, Complete™)를 이용하여 resuspension 하였다. Cell pellet을 얼음 위에 약 10분간 방치시킨 후 13,000×g로 2분간 원심분리하여 supernatants (cytosolic extracts)를 취하였으며 즉시 dry ice/ethanol bath에 보관하였다. Pelleted nuclei는 60 μl의 high salt buffer (20mM HEPES, pH7.9, 420mM NaCl, 10mM KCl, 0.1mM NaVO₄, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 20% glycerol, supplemented with Complete™)로 resuspension 한 후 protein 추출을 위해 약 30분간 shaking하였다. 이를 13,000×g로 10 분간 원심분리한 후 supernatants를 취하였다. 분리된 핵질과 세포질의 순도는 UI SnRNP 70과 beta-tubulin에 대한 immunoblotting을 통하여 각각 검증하였다.

5) Immunoblotting Assay

Lysis buffer [20mM Tris (pH7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5mM sodium phosphate, 1mM beta-glycerolphosphate, 1mM NaVO₄, 1 mM PMSF]를 이용하여 세포를 용해시킨 후 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 약 20 g의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였으며 NF-B/p65-, phospho-Erk, phospho-p38-specific antibody(SantaCruz biotechnology)를 이용하여 Western blot을 수행하였다. Antibody binding은 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) 방법을 통해 검출하였으며 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 사용하였다.

6) Trypan blue exclusion assay

Ethanol-induced apoptosis와 NFkB 활성화와의 관련성에 대해 알아보기 위하여 kupffer cell에 ethanol과 acetaldehyde를 각각 50mM, 400µM로 24시간 처리하였다. 淸肝解酒湯의 영향을 알아보기 위해 淸肝解酒湯(1, 10, 100 µg/ml)을 6시간 동안 전처리하였다. 세포사멸률을 측정하기 위해서 trypsin-EDTA로 떼어낸 세포를 원심분리하여 cell pellete를 얻은 후, 이를 다시 cold PBS(phosphate buffered saline)에서 5×10⁵cells/ml가 되도록 재현탁하였다. 슬라이드에 0.5ml suspension을 준비하고, Trypan blue solution으로 염색한 후 현미경으로 death cell을 계수하여 총세포수와의 비를 계산하였다.

III. 結 果

1. 淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NFkB 활성화에 미치는 영향

淸肝解酒湯의 농도에 따른 NFkB의 활성화 정도를 측정하기 위하여, kupffer cell(1×10⁵cells/well)에 각각 0, 1, 10, 100µg/ml 농도의 淸肝解酒湯을 투여하고, 24시간 이후 NFkB의 nuclear translocation을 분석하였다. NFkB 활성화 정도를 나타내기 위하여, immunoblotting assay를 통해 핵질과 세포질에 있는 NFkB의 양을 각각 측정하고, 핵질에 있는 NFkB 양과 세포질에 있는 NFkB 양의 비를 구하였다. 또, 처리 시간에 따른 NFkB의 활성화 정도를 측정하기 위하여, kupffer cell(1×10⁵cells/well)에 10µg/ml 농도의 淸肝解酒湯을 투여하고, 각각 0, 2, 6, 12, 24시간이 지난 후 위와 동일한 방법으로 NFkB 활성화 정도를 측정하였다. 그 결과, 淸肝解酒湯은 처리 농도와 처리시간에 비례하여 kupffer cell의 NFkB의 활성을 증가시켰다(Table 1).

2. 淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NFkB 신호전달계 구성 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향

淸肝解酒湯의 농도에 따른 NFkB 신호전달계 구성 유전자(NFkB, IκB, IKKβ, MKK6, MKK4)의 활성화 정도를 측정하기 위하여, kupffer cell(1×10⁵cells/well)에 각각 0, 1, 10, 100µg/ml 농도의 淸肝解酒湯을 투여하고, 24시간 이후 target gene들의 expression level을 분석하였다. Quantitative RT-PCR을 시행한 후 electrophoresis, densitometric analysis를 통해 target gene들의 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 또, 처리 시간에 따른 NFkB 신호전달계 구성 유전자의 활성화 정도를 측정하기 위하여, kupffer cell(1×10⁵cells/well)에 10µg/ml 농도의 淸肝解酒湯을 투여하고, 각각 0, 2, 6, 12, 24시간이 지난 후 위와 동일한 방법으로 NFkB 신호전달계 구

Table 1. Effect of *Chungganhaeju-tang*(CGHJT) on NFkB Activation in Kuffer Cells

	Treated (µg/ml; 24hrs)				Treated (hrs; 10µg/ml)					
	0	1	10	100	0	2	6	12	24	
Exp. 1	1.00	1.86	2.66	4.02	Exp. 3	1.00	1.04	1.84	2.72	2.82
Exp. 2	1.00	1.78	2.64	3.56	Exp. 4	1.00	1.12	1.68	2.52	2.70

; Each value represents relative ratio of nuclear NFkB/cytoplasmic NFkB when that of the control, CGHJT untreated, is set to 1.00.

성 유전자의 활성화 정도를 측정하였다. 그 결과, 清肝解酒湯은 NFκB 신호전달계 구성 유전자의 mRNA 발현에 영향을 미치지 않음이 관찰되었다 (Table 2).

3. 清肝解酒湯이 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유발되는 kupffer cell의 apoptosis에 미치는 영향
 清肝解酒湯이 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유발되는 kupffer cell의 apoptosis에 미치는 영향을 측정하기 위하여, kupffer cell(1×10^5 cells/well)에 清肝解酒湯을 0, 1, 10, 100 μg/ml 농도로 투여하고 6시간이 지난 후, 각각 ethanol(0, 1, 10, 50 mM) 및 acetaldehyde(0, 100, 200, 400 μM)을 투여하였다. 24시간 이후 trypan blue exclusion assay를 통해 apoptosis 정도를 측정하였다. 그 결과 清肝解酒湯은 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 kupffer cell의 apoptosis를 처리 농도에 비례하여 억제시킴이 관찰되었다(Table 3).

4. Ethanol 및 acetaldehyde-induced apoptosis에 대한 清肝解酒湯의 억제효과와 NFκB 활성화와의 관련성 분석

Ethanol 및 acetaldehyde-induced apoptosis에 대한 清肝解酒湯의 억제효과와 NFκB 활성화와의 관련성 여부를 판단하기 위하여, dominant negative NFκB inhibitor인 IκBΔN의 유전자를 transfection하여 NFκB의 활성화를 억제한 후에도 ethanol 및 acetaldehyde-induced apoptosis에 대한 清肝解酒湯의 억제효과가 나타나는지 확인하였다. 그 결과, IκBΔN transfection을 통하여 NFκB의 활성화를 억제시키면 ethanol, acetaldehyde에 의한 kupffer cell의 apoptosis에 대한 清肝解酒湯의 억제작용이 상당히 둔화됨이 관찰되었다(Table 4).

5. 清肝解酒湯이 ethanol-induced NFκB target 유전자의 발현에 미치는 영향

清肝解酒湯에 의한 NFκB의 활성화가 inflammatory genes(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8)의 발현을 유발

Table 2. Effect of CGHJT on mRNA Expression of NFκB Signal Transduction Genes

	Treated (μg/ml; 24hrs)					Treated (hrs: 10μg/ml)				
	0	1	10	100		0	12	24	48	72
NFκB	1.00	1.04	1.12	0.96	NFκB	1.00	0.92	0.98	0.98	1.02
IκB	1.00	0.92	1.06	1.02	IκB	1.00	0.98	1.00	0.94	1.00
IKKβ	1.00	1.04	1.06	0.96	IKKβ	1.00	0.96	1.02	1.06	1.06
MKK6	1.00	0.94	0.94	0.96	MKK6	1.00	1.02	1.04	1.00	0.94
MKK4	1.00	1.08	0.96	1.02	MKK4	1.00	1.04	0.98	1.04	1.02

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

Table 3. Effect of CGHJT on Ethanol or Acetaldehyde Induced Apoptosis of Kupffer Cells

CGHJT(μg/ml)	Ethanol (mM; 24hrs)				Acetaldehyde (μM; 24hrs)			
	0	1	10	50	0	100	200	400
0	28	68	162	288	28	98	212	316
1	24	66	122	216	24	78	132	220
10	32	70	84	162	32	80	98	160
100	22	62	64	74	22	72	66	84

; Each value represents apoptotic cells per 500 cells.

하는지 여부를 확인하기 위하여, kupffer cell(1×10^5 cells/well)에 淸肝解酒湯을 0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 투여하고 6시간이 지난 후, 각각 ethanol(0, 1, 10, 50mM)을 투여하였다. 24시간 이후 inflammatory gene들의 expression level을 분석하였다. Quantitative RT-PCR을 시행한 후 electrophoresis, densitometric analysis를 통해 target gene들의 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 그 결과, 淸肝解酒湯은 ethanol에 의해 증가하는 inflammatory cytokine의 mRNA 발현을 오히려 감소시키는 것으로 관찰되었다(Table 5).

IV. 考 察

간은 재생 능력이 뛰어나서 음주로 인한 급성 간 손상이 있더라도 음주를 계속하지 않는한 손상은 쉽게 회복된다. 그러나 간손상이 반복되어 간조직에 비가역적 변화가 일어나면 간경변증으로 진행하여, 결국 간경변증의 여러 합병증으로 사망하게 된다. 알코올에 의한 간손상시 초기에 흔히 나타나는 소견은 지방간이며, 음주를 계속하면 알코올성 간염이 유발되고, 알코올성 간염에서 간경변증으로 이행하는 것으로 알려져 있다¹².

알코올 소비의 증가 추세는 알코올성 간질환의 발생과 밀접한 관계가 있으며, 최근의 보고에서 알

Table 4. Effect of CGHJT on Ethanol or Acetaldehyde Induced Apoptosis of Kupffer Cells after I κ B Δ N Gene Transfection

	Ethanol (mM; 24hrs)				Acetaldehyde (μM ; 24hrs)			
	0	1	10	50	0	100	200	400
Control cell + CGHJT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
0	24	60	174	292	20	90	208	322
1	28	72	142	222	22	74	168	212
10	28	74	80	172	26	70	116	174
100	26	68	68	70	24	52	72	88
I κ B Δ N transfected kupffer cell + CGHJT ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
0	28	72	172	302	30	106	244	326
1	26	68	160	266	24	98	224	302
10	28	70	144	212	28	96	196	268
100	24	64	128	188	26	88	152	128

; Each value represents apoptotic cells per 500 cells.

Table 5. Effect of CGHJT on mRNA Expression of Inflammatory Cytokine Genes

Ethanol(mM, 24hrs)	- CGHJT (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)				+ CGHJT (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	1	10	50	0	1	10	50
TNF- α	1.00	1.32	1.84	2.72	1.02	1.18	1.42	1.98
IL-1 β	1.00	1.46	1.76	2.42	0.98	1.34	1.28	1.90
IL-6	1.00	1.66	1.92	2.22	1.04	1.48	1.46	1.68
IL-8	1.00	1.44	1.72	2.28	1.02	1.40	1.30	1.76

; Each value represents relative ratio of each gene mRNA/GAPDH mRNA when that of the control, neither CGHJT nor ethanol treated, is set to 1.00.

코올성 간경변증이 현저히 증가하는 추세를 보여주고 있다. 1980년대에 우리나라 간경변증의 원인으로 65-80%가 B형 간염바이러스이고, 알코올성은 7%에 불과하였으나, 1990년대 후반의 조사에서는 알코올성 간경변증이 30-38%를 차지할 정도로 증가하여 최근에 알코올에 의한 간경변증의 증가를 반영하고 있음을 보여준다^{2,3}.

알코올성 간질환은 장기적인 의학적 관리와 주의 깊은 치료가 필요로 하는 심각한 질환임에 분명하다. 아직까지 알코올성 간질환의 병인론에 대하여 여러 각도로 접근하여 최근 다양한 약물이 소개되고 있으나 널리 인정을 받지 못하고 있으며, 알코올성 간질환의 치료는 여전히 근본적인 치료 방법을 찾지 못한 채 보존적 처치에 한정되어 있어^{5,6}, 효과적인 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

한의학에서는 飲酒의 過度로 因한 內傷을 酒傷이라 하며, 이에 관한 기록은 『內經』에서부터 찾아볼 수 있다. 『內經』에서는 『靈樞·論勇篇』에서 “酒氣는 標悍한데, 飲酒하면 氣가 上逆하여 胸中에 充滿되어 肝浮膽橫한다”고 하였고, 『素問·生氣通天論』에서는 “大飲하면 氣가 逆한다”고 하였으며, 『素問·厥論』에서는 “醉飽入房하면 氣가 胸中에 쌓여 不得散하고 酒氣와 穀氣가 相搏하여 中焦에 熱이 盛하게 되므로 全身에 熱이 퍼지고 內熱이 생겨 尿赤한다”고 하여 飲酒過度에 依한 氣의 變調와 病理現象에 對하여 記述하였다. 이후 歷代 醫家들의 풍부한 임상적 경험을 거치면서, 李東垣은 酒傷病의 治療는 發散汗出하고, 다음으로 利小便하며, 其濕을 上下로 分消하는 것을 原則으로 하였는데, 이후 많은 醫家들이 이 治法을 사용하였다¹³.

본 실험에서 사용한 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 加味하여 구성된 方劑이다. 對金飲子は 和劑局方에 최초로 記載되어 있으며, 固元益氣, 健脾進食, 和胃祛痰하여 營衛를 調和시켜 준다하였고, 이후 歷代 醫家들에 의해 酒傷症의 대표적인 處方으로 적용되어 왔으며, 동물 실험을 통해서도 알코

올성 간손상에 의한 비정상적 LFT level을 정상화시키는 것이 확인되었다¹⁴. 茵陳四苓散은 濕熱發黃을 다스리는 茵陳五苓散에서 肉桂를 去하여 만들어진 處方으로, 각종 肝疾患에 사용되는 다양한 處方들의 根幹이 되는 方劑이며, 알코올성 간손상에서 간손상을 반영하는 각종 생화학 검사치를 호전시키는 것이 동물 실험을 통해 보고된 바 있다¹⁵. 葛根은 性平味甘無毒, 主風寒頭痛, 解肌發表出汗, 開腠理, 解酒毒, 止煩渴, 開胃下食, 治胸膈熱, 通小腸, 療金瘡¹⁶하여 酒傷에 대표적인 약재로 활용되고 있다. Keung과 Vallee는 동물 실험에서 Syrian golden hamster에게 갈근을 투여하였을 때 알코올 선호도가 유의하게 감소함을 관찰하고 갈근이 알코올 의존 환자의 치료에 효과가 있을 것이라고 제안하였으며¹⁷, 임상 실험에서도 주정 중독 환자의 음주 욕구를 감소시키는 효능이 있음이 입증된 바 있다¹⁸. 葛根에 함유된 daidzin과 daidzein은 각각, human mitochondrial aldehyde dehydrogenase(ALDH-I)와 human gamma gamma-alcohol dehydrogenase를 억제하는 작용이 있으나, 두 성분은 적정 용량으로 투여될 경우 음주 욕구를 억제시키면서도 acetaldehyde와 ethanol의 전체적 대사에는 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀져, 기존의 알코올 의존 치료제인 비선택적 ALDH 또는 class I ADH isoenzyme 억제제와는 달리 효과적이면서도 안전한 새로운 알코올 의존 치료제로 사용될 수 있음이 보고된 바 있다¹⁹. 民間에서 흔히 五理木 또는 榆理木이라고 부르는 赤楊은 그 性이 涼하고, 味는 苦澁하며, 效能은 消熱, 降火, 止血, 收斂하여, 衄血, 腸炎, 泄瀉, 外傷出血을 치료한다고 알려져 있다. 특히 單方으로 酒滯, 알코올 중독, 알코올성 간염 등에 활용되어 왔고, 그 安全性이 실험적으로 검증된 바 있으며²⁰, 혈중 알코올 농도를 감소시켜 주고, 담즙배설을 촉진하며, 약물대사효소들의 활성도를 정상적으로 회복시켰고, glutathione량을 증가시켜 lipid peroxidation을 억제하는 등 알코올에 의한 간손상을 효과적으로 보호해 주는 것이 실험적으로 입증된 바 있다²¹. 對金飲子에 茵陳四苓散을 合方하고 葛根, 赤楊을 加味하여

구성된 淸肝解酒湯은 동물 실험을 통해, 알코올 대사 과정에서 acetaldehyde의 생성을 억제하고, 알코올에 의해 야기된 비정상적 LFT level을 호전시키는 작용이 있음이 검증되었고⁷, 임상 실험을 통해서도 알코올성 간손상 환자의 임상 증상 및 LFT level을 호전시키는 작용이 있음이 보고된 바 있다⁸. 최근 에탄올과 아세트알데하이드에 의해 유발된 HepG2 cell의 감소된 세포활성과 세포증식을 증가시키고, apoptosis를 감소시키며, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시켜 간세포를 보호하는 효과가 있음이 확인되었다⁹.

NF κ B는 여러 가지 cytokine과 mitogen들에 의해 활성화되는 전사 조절자로서, 염증, 감염이나 stress 등에 대한 생체 반응에 관련된 유전자들의 핵심적 전사 조절자로 알려져 있으며²², 다양한 사이토카인, 급성기 반응 단백질, 면역 글로불린 등의 전사(transcription)에 관여한다. 비활성화 상태의 NF κ B는 inhibitor I κ B와 함께 세포질(cytoplasm) 속에 있으며, inhibitor I κ B는 NF κ B가 핵(nucleus) 속으로 이동하는 것을 막아준다. 이러한 상태에서 활성화를 야기하는 자극이 가해지면, I κ B는 인산화(phosphorylation) 과정을 거친 후 분해되어 NF κ B의 이동을 억제하지 못하게 되고, NF κ B는 핵(nucleus) 속으로 이동한 후, target 유전자들의 전사(transcription)를 야기하게 된다²³⁻²⁵.

NF κ B는 endotoxin 이나 oxidative stress에 의해 활성화되어 염증 반응을 매개하는 역할을 하기도 하지만²⁶⁻²⁹, apoptosis를 억제하여 생존에 필수적인 자로 작용하는 것으로 알려져³⁰⁻³³, 여러 가지 유전자들의 발현을 조절함으로써 간세포의 다양한 생리·병리적 반응을 매개하는 주요한 전사(transcription) 조절자로 인식되고 있다. NF κ B의 활성화는 TNF- α signaling에 의한 apoptosis에 대항하는 강력한 antiapoptotic signal로 작용한다³⁰⁻³³. NF κ B의 subunit인 RelA(p65)가 결손된 mouse fibroblast가 TNF- α 에 의해 활성도가 급격히 감소하는 것이 관찰된 바 있고³⁰, dominant-negative I κ B α 인 I κ B α M에 의해 NF κ B의 활성을 강력히 억제할

경우 TNF- α induced apoptosis가 매우 활발해지는 것이 보고되었으며³¹, 항암 치료에 있어서는 NF κ B의 활성화를 억제함으로써 암세포의 apoptosis를 증가시킬 수 있는 것으로 알려졌다³². 이러한 NF κ B 활성화에 의한 antiapoptotic effect는 간세포에서도 발생한다. NF κ B의 subunit인 RelA가 결손된 mouse embryo는 과도한 apoptosis로 인해 간세포가 정상적인 발달을 하지 못하고 퇴화되어 사망하였으며³⁴, I κ B kinase 2 gene이 결손되어 NF κ B 활성화가 일어날 수 없는 mouse에서도 비슷한 상황이 발생하였다³⁵. 한편, 부분적 간절제술 후 간의 재생 과정에 있어서도 NF κ B의 활성화가 억제될 경우 간의 정상적 재생 과정을 거치지 못하고 과도한 apoptosis로 인한 세포 사멸이 발생하는 것으로 알려졌다³⁶.

본 실험은 淸肝解酒湯이 알코올성 간질환의 병리 과정에서 발생하는 간세포의 apoptosis를 억제하는 과정을 NF κ B가 매개함을 규명하기 위해 시행되었다. 우선, 淸肝解酒湯이 처리농도와 처리시간에 비례하여 kupffer cell의 NF κ B의 활성을 유도하며, 처리 농도에 비례하여 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 kupffer cell의 apoptosis를 억제하는 것을 각각 확인하였다(Table 1, Table 3). 또한, ethanol 및 acetaldehyde-induced apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 억제효과가 NF κ B 활성화에 의해 매개되는지를 판단하기 위하여, dominant negative NF κ B inhibitor인 I κ B Δ N의 유전자를 transfection하여 NF κ B의 활성화를 억제한 후 ethanol 및 acetaldehyde-induced apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 억제효과가 약화되는지를 관찰하였다. 그 결과, I κ B Δ N transfection을 통하여 NF κ B의 활성화를 억제시키면 ethanol 및 acetaldehyde에 의하여 발생하는 kupffer cell의 apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 억제작용이 현격하게 둔화됨이 관찰되었다(Table 4). 이는 NF κ B의 활성화가 간세포의 과도한 apoptosis를 막아준다는 기존의 보고들³⁴⁻³⁶과도 일치하는 결과로서, 알코올성 간질환에서 나타나는 간세포의 apoptosis를 淸肝解酒湯이 억제하는 과정에서 NF κ B의 활성화가 중요한 기전임을 시사하는 것으로 생각된다.

淸肝解酒湯이 NFκB 활성화를 일으키기 위해 NFκB 신호전달계 구성 유전자들의 transcription을 증가시키는지를 조사하기 위해, quantitative RT-PCR, electrophoresis, densitometric analysis를 통해 target gene들의 mRNA 량을 측정하였으나, 淸肝解酒湯의 투여가 신호전달계 구성 유전자들의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다(Table 2). 따라서, 淸肝解酒湯은 NFκB 신호전달계 구성 물질들의 새로운 합성을 유도하는 것이 아니라, IκB의 인산화(phosphorylation)를 야기하는 자극인자로 작용하여, 인산화된 IκB는 분해되어 NFκB의 이동을 억제하지 못하게 되고, NFκB는 핵(nucleus) 속으로 이동한 후, 간세포의 apoptosis를 억제하는 어떤 물질의 유전자를 발현시킬 것으로 추정된다.

한편, oxidative stress등에 의한 inflammatory cytokine gene들의 발현 역시 NFκB 활성화를 통해 매개됨이 알려져 있다²⁶⁻²⁹. 이에, 淸肝解酒湯에 의한 NFκB의 활성화가 알코올성 간질환을 매개하는 cytokine들의 발현을 야기하는지를 확인하기 위해, 淸肝解酒湯을 투여한 kupffer cell과 투여하지 않은 kupffer cell에, 각각 ethanol을 투여한 후, inflammatory gene들의 expression level을 분석하였다. 발현된 mRNA 량을 비교한 결과, 淸肝解酒湯은 ethanol에 의해 증가하는 inflammatory cytokine의 mRNA 발현을 감소시키는 것으로 관찰되었다(Table 5).

따라서, 淸肝解酒湯에 의해 활성화된 NFκB는 inflammatory cytokine gene의 발현을 유도하는 신호로는 작용하지 않거나, 淸肝解酒湯이 inflammatory cytokine gene의 활성화를 억제하는 다른 강력한 pathway의 존재 가능성을 시사한다.

V. 結 論

淸肝解酒湯이 알코올성 간질환의 병리과정에서 발생하는 간세포의 apoptosis를 억제시키는 기전을 규명하기 위하여, NFκB의 활성화에 대한 淸肝解酒湯의 영향을 조사하였고, ethanol 및 acetaldehyde-

induced apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 억제효과가 NFκB 활성화에 의해 매개되는지를 판단하기 위하여, dominant negative NFκB inhibitor인 IκBΔN의 유전자를 transfection하여 NFκB의 활성화를 억제한 후 ethanol 및 acetaldehyde-induced apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 억제효과가 약화되는지를 관찰하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 淸肝解酒湯은 처리농도와 처리시간에 비례하여 kupffer cell의 NFκB의 활성을 유도하였다.
2. 淸肝解酒湯은 NFκB 신호전달계 구성 유전자(NFκB, IκB, IKKβ, MKK6, MKK4)의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다.
3. 淸肝解酒湯은 처리 농도에 비례하여 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 kupffer cell의 apoptosis를 억제하였다.
4. 淸肝解酒湯은 ethanol에 의해 증가하는 inflammatory cytokine(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8)들의 mRNA 발현을 감소시켰다.
5. IκBΔN(dominant negative NFκB inhibitor) transfection을 통하여 NFκB의 활성화를 억제시키면 ethanol 및 acetaldehyde에 의한 kupffer cell의 apoptosis에 있어서, 淸肝解酒湯의 억제작용이 둔화되었다.

이상의 결과에서 淸肝解酒湯은 NFκB의 활성화 및 inflammatory cytokine mRNA의 발현 감소를 통하여, kupffer cell에서 ethanol 및 acetaldehyde induced apoptosis를 억제시킴을 알 수 있었다. 향후, NFκB의 활성화가 kupffer cell의 apoptosis를 억제하는 기전과 淸肝解酒湯이 inflammatory cytokine gene의 발현을 억제하는 기전에 관하여는 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 변관수. 알코올성 간질환의 임상 및 병리학적 측면. 대한간학회지 1997;3:307-15.
2. 한은경, 박찬일, 이상인. 간경변증의 원인적 분류와 형태학적 특징. 대한병리학회지 1990;24:

- 412-22.
3. 정은미, 황성규, 박홍훈, 박지한, 김형태, 오성욱, 고광현, 홍성표, 박필원, 임규성, 김세현. 간경변 환자에서 CTP 점수와 MELD 점수에 따른 사망률 분석. *대한간학회지* 2003;9:98-106.
 4. 권영오. 알코올성 간질환의 새로운 치료법과 전망. *대한간학회지* 2003;9(suppl1):36-45.
 5. Fulton S, McCullough AJ. Treatment of alcoholic hepatitis. *Clin Liver Dis* 1998;2:779-819.
 6. Mullen KD, Dasarthy S. Potential new therapies for alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 1998;2:851-81.
 7. 광미애, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올대사 및 손상간에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2000;21:68-76.
 8. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. *대한한의학회지* 2001;22:107-13.
 9. 김병삼, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine 발현에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2003;24:190-201.
 10. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
 11. 지형준 외. *대한약전 및 대한약전의 한약규격주해*. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998, p.58, 65, 274, 286, 310, 501, 522, 536, 566, 610, 700.
 12. Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system*. 11th edition. Oxford: Blackwell Science; 2002, pp.381-98.
 13. 전국한외과대학 간계내과학교수 공저. *간계내과학*. 서울: 동양의학연구원; 2001, p.118.
 14. 김영철, 우홍정, 김병운. 加味對金飮子の 효능에 관한 실험적 연구. *경희한의대논문집* 1993;16:7-29.
 15. 박형규, 김동우, 이장훈, 우홍정, 김병운. 茵陳四苓散이 급성 Alcohol, 고지혈증 및 Galactosamine 중독 白鼠의 간손상에 미치는 영향. *대한한의학회지* 1993;14:254-69.
 16. 허준 저, 동의보감국역위원회 역. *대역동의보감*. 서울: 법인문화사; 1999, p.1931.
 17. Keung WM, Vallee BL. Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian golden hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10008-12.
 18. 윤종태, 김명정, 김성곤. 갈근의 장기 투여가 주정 중독 환자의 음주 욕구에 미치는 영향. *신경정신의학* 1995;34:1937-47.
 19. Keung WM, Vallee BL. Therapeutic lessons from traditional Oriental medicine to contemporary Occidental pharmacology. *EXS* 1994;71:371-81.
 20. 배현수, 우홍정, 김덕호, 김병운. 赤楊의 독성 및 간장애에 미치는 영향. *동양의학* 1991;17:16-21.
 21. 홍미숙, 김동우, 이장훈, 우홍정, 김병운. 赤楊生肝湯이 알코올성 간손상에 미치는 효과. *경희한의대논문집* 1992;15:169-201.
 22. Baldwin AS, Azizkhan JC, Jensen DE, Beg AA, Coodly LR. Induction of NF- κ B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991;11:4943-51.
 23. Baeuerle PA, Baltimore D. NF κ B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
 24. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor κ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-71.
 25. French SW, Miyamoto K, Tsukamoto H. Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10(suppl6):13S-9S.
 26. McClain CJ, Hill D, Schmidt J, Diehl AM. Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993;13:170-82.
 27. Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao

- L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999;30: 934-43.
28. Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, Peters D, Tahan SR, Dannenberg AJ. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 1997;112:943-51.
29. Nanji AA, Zhao S, Sadrzadeh SMH, Waxman DJ. Use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction to evaluate in-vivo cytokine gene expression in rats fed ethanol for long periods. *Hepatology* 1994;19:1483-7.
30. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996;274:782-4.
31. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996;274:787-9.
32. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 1996;87:565-76.
33. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274:784-7.
34. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappaB. *Nature* 1995;376: 167-70.
35. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* 1999;284:321-25.
36. Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrs KE, Schoonhoven R, Grisham JW, Brenner DA. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998;101:802-11.