

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 인터페론 신호전달계에 미치는 영향

이종훈, 김영철, 이장훈, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of *Injinchunggantang* on Interferon Signaling Pathway of HepG2 Cells

Jong Hoon, Yi, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

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

Objectives/Methods : To analyze the effect of *Injinchunggantang*(IJCGT) to Interferon- α/β signal transmission system in HepG2 cells, HepG2 Cell were treated with IJCGT. Also, revelation of MxA, 2'5'-OAS mRNA led by Interferon- α/β and revelation and activation of Jak1, TYK1, and STAT 1, all main signal transmission factors, were analyzed.

Results : The analysis resulted in the following

1. With interferon α/β there was no affect cell propagation of Hep G2 cells. With IJCGT alone, cell propagation of HepG2 was promoted, and cell propagation control function was recovered.
2. With interferon α/β cell death was unaffected. With IJCGT apoptosis of HepG2 cell was restrained, and the cell's reaction to interferon was unaffected.
3. With interferon α/β treatment mRNA revelation of MxA and 2'5'-OAS was induced. When HepG2 cells were injected with IJCGT without interferon α/β treatment, mRNA revelation of MxA and 2'5'-OAS increased in proportion to the treatment density. With pre-treatment of IJCGT, led with interferon α/β , promoted revelation of MxA, 2'5' -OAS mRNA.
4. Though mRNA revelation of Jak1, TYK1 and STAT1 was unaffected with IJCGT, activation of STAT1 was promoted with an increase of phosphorylation of STAT1 protein. With pre-treatment of IJCGT, Jak1, TYK2, STAT1 phosphorylation, led with interferon, strengthened.
5. TNF- α , IL-1 β and LPS present, revelation of MxA and 2'5'-OAS mRNA led by interferon was restrained when HepG2 cells were treated with IJCGT, and the interferon signal transmission system restraint action led by inflammatory cytokines was moderated.

Conclusion : These results support a role for IJCGT in promotion of anti-virus action through maintainance of the liver's sensibility toward interferon. A clinical study of an interferon treated patient treated also with IJCGT is needed to determine its efficacy.

Key Words: Interferon- α/β , *Injinchunggantang*(IJCGT), Jak-STAT, MxA, 2'5'-OAS

1. 緒 論

우리나라의 경우는 B형 간염 바이러스에 의한

만성 간질환의 이환율이 세계적으로 높은 편일 뿐 아니라, 최근에는 C형 간염 바이러스에 대한 감염 비율도 점점 높아지고 있는 추세로, 우리나라 40-50 대 남성 사망률을 높이는 주요 원인이 되고 있다¹.

전세계적으로 1억 7천만이 넘는 사람들이 C형 간염 바이러스에 감염되어 있다는 보고가 있다². C

· 접수 : 2005. 1. 20 · 채택 : 2005. 2. 17
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118 Fax. 02-958-9120
E-mail : hjwoo@khu.ac.kr)

형 간염 바이러스에 감염되면 60-85%가 만성으로 진행되고, 만성 C형 간염 환자 중에서 10-15%는 10-20년 후에 간경변으로 진행된다³. 만성 C형 간염 환자들이 20년 후 간암으로 이어질 가능성은 1-5% 정도이지만, 간경변이 있을 경우는 이 비율이 더 높아진다⁴.

인터페론 알파와 리바비린의 병용 투여가 만성 C형 간염의 치료에 효과적이라는 최근의 보고에도 불구하고, 이러한 치료로도 바이러스를 완전히 없애는데 어려움이 많은 것이 현실이다. 인터페론 저항성에 대한 원인은 상당히 다양하고, 또 정확한 기전도 아직 밝혀져 있지 않다^{5,6}. 따라서 인터페론 치료에 대한 저항성을 감소시키는 약물 개발이 필요하다.

茵陳淸肝湯은 淸熱利濕시키는 茵陳四苓散⁷에 수종의 한약재를 가미한 처방으로 임상에서 바이러스성 간질환 치료에 광범위하게 사용되고 있다. 茵陳淸肝湯에 대한 연구로 禹⁸는 茵陳淸肝湯이 만성 B형 간염 환자에서 AST, ALT 등의 혈청학적 개선과 HBeAg의 음전 효과가 있음을 보고하였고, 姜⁹은 茵陳淸肝湯이 마우스 간염바이러스와 수침 스트레스로 유발한 마우스의 간경변증에 있어 간기능개선 및 간손상회복에 효과가 있음을 보고하였다. 최근에는 한약의 효능에 대한 분자생물학적 연구로 茵陳淸肝湯과 인진사령산 및 인진의 분획물로 세포사멸

을 억제하며, 간세포를 보호하는 효과가 있음이 보고되었다^{10,4}.

Jak-STAT은 인터페론의 신호전달매개체로 처음 알려진 물질로¹⁵, Jak-STAT 신호전달계는 interferon target gene이면서 최종적으로는 항바이러스성 단백질인 myxovirus resistance A(MxA)와 oligoadenylate synthetase(2'5'-OAS)를 활성화시켜 항바이러스 작용을 나타내게 된다^{16,9}.

이에 저자는 茵陳淸肝湯이 HepG2 cell의 인터페론 신호전달계에 미치는 영향을 분석하고자 茵陳淸肝湯을 HepG2 cell에 전처리하고, 인터페론-α/β의 작용을 매개하는 핵심 신호전달인자인 Jak1, TYK2, STAT1의 발현과 활성화 분석을 통해 최종적으로 항바이러스성 단백질인 MxA, 2'5'-OAS mRNA를 발현시키는 것을 분석한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해²⁰에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of Injinchungantang

構成藥物	學名	生藥名	用量(g)
茵陳	<i>Artemisia capillaris Thunberg</i>	Artemisiae Capillaris Herba	50
地榆(炒炭)	<i>Sanguisorba officinalis L.</i>	Sanguisorbae Radix	15
白朮	<i>Atractylodes macrocephala Koidzumi</i>	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma Alba	12
豬苓	<i>Polyporus umbellatus Fies</i>	Ployporus	12
茯苓	<i>Poria cocos Wolff</i>	Hoelen	12
覆盆子	<i>Rubus coreanus Miquel</i>	Rubi Fructus	12
澤瀉	<i>Alisma plantago Linne var. parviflorum Torr</i>	Alismatis Rhizoma	8
蘿菔子	<i>Raphanus sativus L.</i>	Raphani Semen	8
青皮	<i>Citrus nobilis Makino</i>	Aurantii Immatri Pericarpium	6
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch.</i>	Glycyrrhizae Radix	6
生薑	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	Zingiberis Rhizoma	12
Total amount			153

2. 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료 (612g)을 3차증류수 (4.8 l)로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 70.6g의 건조추출물을 얻었으며 11.54 %의 수율을 보였다.

3. 인체 간세포에 대한 검액의 처리

茵陳清肝湯이 인터페론 신호전달계의 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 세포를 1×10^5 /well의 밀도로 배양한 후茵陳清肝湯을 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 인터페론 투여 12 시간 전에 처리하였다.茵陳清肝湯을 처리한 HepG2 세포와 처리하지 않은 세포(대조군)는 0.1% trypsin으로 회수하였으며 유전자 발현을 분석하기 위하여 protein 및 RNA를 추출하였다.

III. 實 驗

1. 정량적 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현의 분석

1) RNA의 추출

RT-PCR 분석을 위한 RNA는 Solution D를 이용하여 추출하였으며 RNA는 아래와 같은 방법으로 추출하였다.

① Solution D의 제작

250g의 guanidine isothiocyanate을 293ml의 3차 증류수에 넣은 후 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 첨가하여 65℃에서 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 μl , 2M sodium acetate(pH4.0) 50 μl 를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500 μl , chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 100 μl 를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하

였다.

③ 혼합용액을 15000 RPM에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000 μl 를 넣어 -70℃에서 24시간 침전시켰다.

④ 15000 RPM에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA pellete를 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30 μl 의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

2) cDNA의 제작

① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

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

② 혼합용액이 20 μl 가 되도록 sterile water를 첨가한 후 42℃에서 15분간 방치하였다.

③ 각 시료에 80 μl 의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

3) Primer의 제작

① House keeping gene : Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase(GAPDH)

② Target genes : Myxovirus resistance A(MxA) 2'5'-oligoadenylate synthetase(2'5'-OAS)

Janus family tyrosine kinase(Jak)

Tyrosine kinase(TYK)

Signal transducers and activators of transcription(STAT)

4) Quantitative PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10 x amplification buffer	10 μl
Mixture of dNTP (10 pM)	5 μl
Template cDNA	4 μl
H ₂ O	77 μl

② 표 1에 기술된 mRNA-specific primer를 이용하여 아래의 조건으로 34-40 cycle의 PCR 반응을 시행하였다.

a. First cycle

Denaturation	5 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	1 min at 72°C

b. Subsequent cycles (32-38 cycles)

Denaturation	1 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	1 min at 72°C

c. Last cycle

Denaturation	1 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	10 min at 72°C

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

2. Immunoblotting Assay

Lysis buffer[20 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium phosphate, 1 mM beta-glycerolphosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF]를 이용하여 세포를 용해시킨 후 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 약 20µg의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였으며 anti-Jak1, anti-TYK, anti-STAT1 antibody (SantaCruz biotechnology)를 이용하여 Western blot을 수행하였다. Antibody binding은 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) 방법을 통해 검출하였으며 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 사용하였다.

3. [³H]thymidine incorporation assay를 이용한 세포 증식분석

세포의 DNA 복제에 미치는 인터페론의 영향을 조사하기 위하여 [³H]thymidine incorporation assay를 시행하였다. HepG2 세포를 1 x 10⁵ cells/well 밀도로 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24 시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 인터페론-α 또

Oligonucleotide primer sequences used for quantitative RT-PCR analysis(All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Primer	Nucleotide sequences
GAPDH	Sense	5'-TGACTGTCCGATTGTCAATCCAGGCT-3'
	Antisense	5'-GACATGGATCCCACGAAATCTAGCGAC-3'
MxA	Sense	5'-CCATTACTAGGAACTTTGCATAT-3'
	Antisense	5'-GCTTAAGCTGTACAGCTAGCTTTA-3'
2'5'-OAS	Sense	5'-CGGAAATGCCATCGTGTACTAGAA-3'
	Antisense	5'-TTAGCGATCGAGATCGATGGATGA-3'
Jak1	Sense	5'-CAAATCGCACCATCACCATTGATG-3'
	Antisense	5'-AGGTTCTCTGTCTGATGGACTTA-3'
TYK2	Sense	5'-CTCGGGAACCGGCTGTGTACCGTT-3'
	Antisense	5'-CTGCGGAAGACGTTCCGAAGGCGC-3'
STAT1	Sense	5'-TGACTCAAAAATTCCTGGAGCAGGT-3'
	Antisense	5'-AACCTTGTCTTCACATTCTGAC-3'

는 인터페론-β를 농도별로 처리하였으며 처리 20시간 후에 1.0 μCi/ml의 [³H]thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)를 4시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA내로 incorporation된 trichloroacetic acid precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

4. 인터페론 신호전달계에 대한 TNF-α 및 IL-1β의 영향에 대한 분석

인터페론 신호전달계와 TNF-α 및 IL-1β과의 관련성과 이에 대한茵陳清肝湯의 영향을 조사하기 위하여 HepG2 세포를 1 x 10⁵ cells/well로 6-well plate에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지에서 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 각각 TNF-α (20 ng/ml)와 IL-1β(20 ng/ml)와 Lipopolysaccharide (LPS)(50 μg/ml)를 처리하였다. 인터페론은 TNF-α나 IL-1β 또는 LPS 투여 1시간 후에 투여하였으며茵陳清肝湯의 처리는 TNF-α나 IL-1β 또는 LPS 투여 12시간 전에 시행하였다.

IV. 結果

1. 인터페론이 인체간세포 HepG2의 세포증식에 미치는 영향

1) 인터페론이 HepG2의 세포증식에 미치는 영향
인터페론이 HepG2 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 인터페론-α 및 인터페론-β는 HepG2 세포의 증식에 영향을 미치지 않았다(Table 1, Fig. 1).

2)茵陳清肝湯의 전처리가 인터페론에 의한 HepG2 세포증식조절에 미치는 영향

茵陳清肝湯의 전처리가 인터페론에 의한 HepG2 세포증식조절에 미치는 영향을 관찰한 결과,茵陳清肝湯은 IJCGT의 세포증식기능을 억제하는 것으로 관찰되었다(Table 2, 3, Fig. 2).

2. 인터페론이 인체간세포 HepG2의 세포사멸에 미치는 영향

1) 인터페론이 HepG2의 세포사멸에 미치는 영향
인터페론이 HepG2 세포사멸에 미치는 영향을 관찰한 결과 인터페론은 HepG2의 세포사멸에는 영향을 미치지 않았다(Table 4, Fig. 3).

Table 1. Effect of IFNs on DNA Synthesis of HepG2 Cells

Control	IFN-α (U/ml)			IFN-β (U/ml)		
	50	100	200	50	100	200
4750	4750	4700	4750	4700	4700	4750

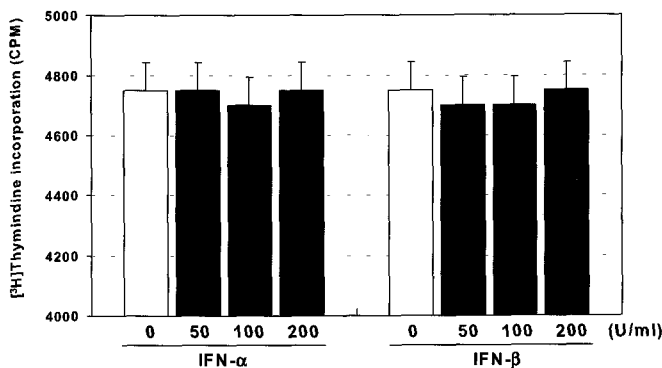


Fig. 1. Effect of IFNs on DNA synthesis of HepG2 cells([³H]thymidine incorporation assay).

Table 2. Interferon- α Suppression of HepG2 Cell Growth in the Presence of IJCGT(^3H)thymidine incorporation Assay)

Control	IJCGT(50 $\mu\text{g/ml}$)	IJCGT pretreatment ($\mu\text{g/ml}$, 12 h) + IFN- α (200 U/ml)		
		1	10	50
4750	5650	4650	4350	4150

Table 3. Interferon- β Suppression of HepG2 Cell Growth in the Presence of IJCGT(^3H)thymidine incorporation Assay)

Control	IJCGT(50 $\mu\text{g/ml}$)	IJCGT pretreatment ($\mu\text{g/ml}$, 12 h) + IFN- β (200 U/ml)		
		1	10	50
4750	5650	4550	4250	4050

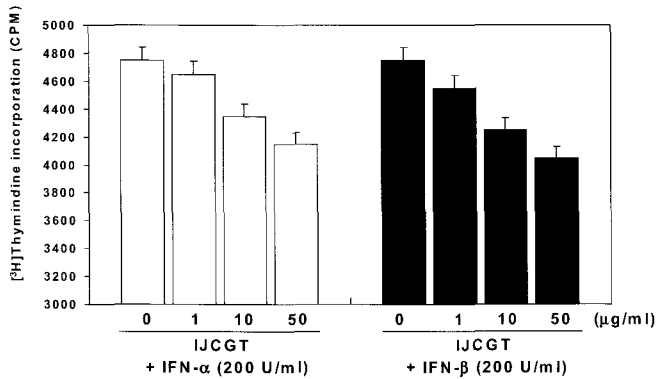


Fig. 2. IJCGT suppress of HepG2 cell growth in the presence of Interferon.

Table 4. Effect of Interferon on Apoptotic Cell Death of HepG2 (Tryphan Blue Exclusion Assay)

Control	IFN- α (U/ml, 24 h)			IFN- β (U/ml, 24 h)		
	50	100	200	50	100	200
63	66	72	68	65	69	70

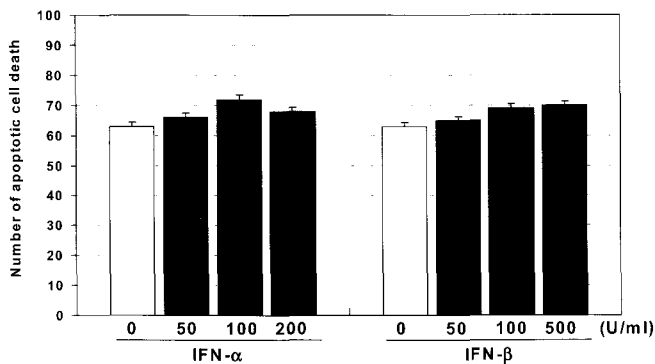


Fig. 3. No effect of interferon on apoptotic cell death of HepG2 (tryphan blue exclusion assay).

2) 茵陳清肝湯의 전처리가 인터페론에 의한 HepG2의 세포사멸조절에 미치는 영향

茵陳清肝湯의 전처리가 인터페론에 의한 HepG2 세포사멸조절에 미치는 영향을 관찰한 결과, 茵陳清肝湯은 HepG2의 세포사멸을 억제하였지만, 인터페론에 의한 HepG2 세포사멸조절에는 영향을 미치지 않았다(Table 5, 6, Fig. 4).

3. 茵陳清肝湯이 인터페론 신호전달계에 미치는 영향

1) 茵陳清肝湯이 인터페론- α target antiviral genes 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 인터페론- α/β target antiviral genes 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 茵陳清肝湯은

antiviral gene expression을 증가시키는 기능이 있는 것으로 밝혀졌다(Table 7, Fig. 5). 또한, 茵陳清肝湯은 인터페론에 의한 antiviral gene expression도 더욱 활성화시키는 작용이 있는 것으로 나타났다 (Table 8, 9, Fig. 6).

2) 茵陳清肝湯이 Jak1, TYK2, STAT1 genes 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 Jak1, TYK2, STAT1 gene 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 인터페론 및 茵陳清肝湯은 Jak1, TYK2, STAT1 유전자 자체의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Table 10, 11, Fig. 7).

Table 5. Effect of Interferon- α on Apoptotic Cell Death of HepG2 in the Presence of IJCGT(Tryphan Blue Exclusion Assay)

IJCGT pretreatment (μ g/ml, 12 h)	0		1		10		50	
IFN- α (200 U/ml, 24 h)	-	+	-	+	-	+	-	+
	63	62	66	65	60	61	51	53

Table 6. Effect of Interferon- β on Apoptotic Cell Death of HepG2 in the Presence of IJCGT(Tryphan Blue Exclusion Assay)

IJCGT pretreatment (μ g/ml, 12 h)	0		1		10		50	
IFN- β (200 U/ml, 24 h)	-	+	-	+	-	+	-	+
	63	60	64	62	58	57	52	54

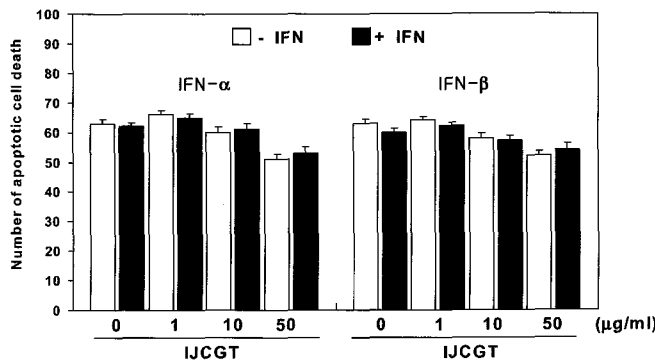


Fig. 4. Effect of IJCGT on apoptotic cell death of HepG2 in the presence of IJCGT(interferon- α/β) (tryphan blue exclusion assay).

Table 7. Induction of Antiviral Interferon Target Gene Expression by IJCGT(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IJCGT ($\mu\text{g/ml}$; 12 h)		
		1	10	50
MxA	1.00	1.16	1.45	1.78
2'5'-OAS	1.00	1.15	1.38	1.80

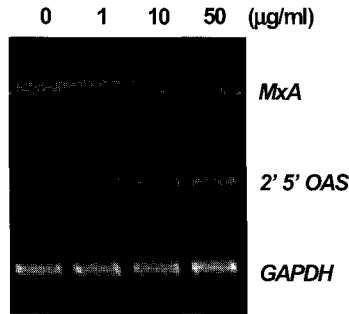


Fig. 5. Induction of antiviral interferon target gene expression by IJCGT(quantitative RT-PCR analysis).

Table 8. Stimulation of Interferon- α induced Antiviral Gene Expression by IJCGT(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IJCGT pretreatment($\mu\text{g/ml}$; 12h) + IFN- α (200 U/ml)			
		0	1	10	50
MxA	1.00	2.85	2.99	3.65	4.12
2'5'-OAS	1.00	2.78	2.89	3.81	4.33

Table 9. Stimulation of Interferon- β induced Antiviral Gene Expression by IJCGT(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IJCGT pretreatment($\mu\text{g/ml}$; 12 h) + IFN- β (200 U/ml)			
		0	1	10	50
MxA	1.00	3.01	3.04	3.76	4.23
2'5'-OAS	1.00	2.84	3.03	3.88	4.45

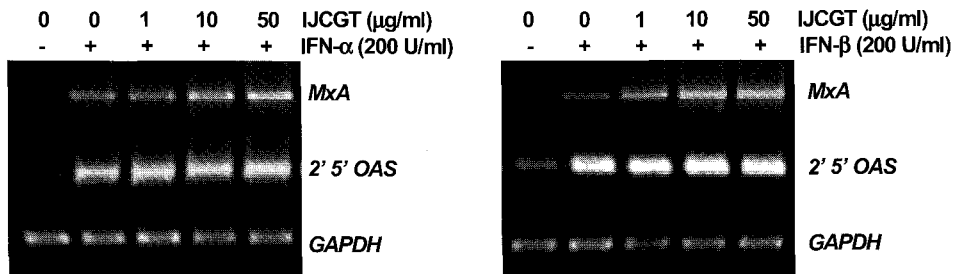


Fig. 6. Stimulation of interferon- α/β -induced antiviral gene expression by IJCGT(quantitative RT-PCR analysis).

Table 10. Effect of IJCGT on mRNA Expression of Jak1, TYK2, and STAT1(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IJCGT pretreatment ($\mu\text{g/ml}$; 12 h) + IFN- α (200 U/ml)			
		0	1	10	50
Jak1	1.00	1.04	0.96	1.07	1.03
TYK2	1.00	0.98	1.05	0.97	1.03
STAT1	1.00	1.02	0.95	0.92	1.01

Table 11. Effect of IJCGT on mRNA Expression of Jak1, TYK2, and STAT1(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IJCGT pretreatment ($\mu\text{g/ml}$; 12 h) + IFN- β (200 U/ml)			
		0	1	10	50
Jak1	1.00	0.91	0.97	0.98	1.05
TYK2	1.00	0.94	0.95	1.06	0.98
STAT1	1.00	0.99	1.03	1.04	0.96

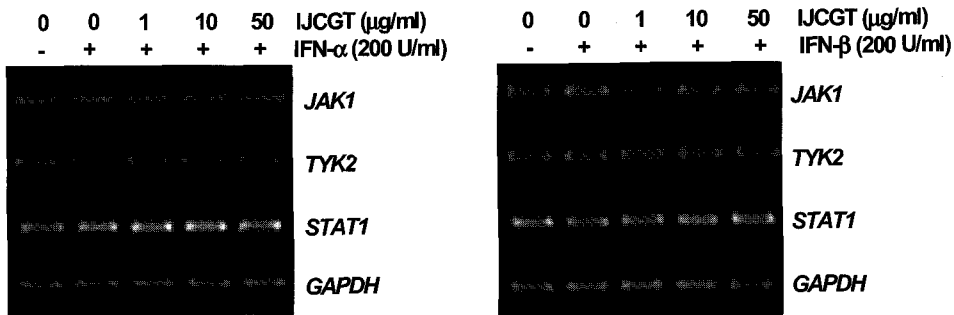


Fig. 7. Effect of IJCGT on mRNA expression of Jak1, TYK2, and STAT1(quantitative RT-PCR analysis).

3) 茵陳清肝湯이 인터페론에 의한 Jak-STAT 신호전달계 활성화에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 인터페론에 의한 Jak-STAT 신호전달계 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 茵陳清肝湯은 Jak1 및 TYK2의 활성화에는 영향을 미치지 않았으나 STAT1의 활성화를 유도하는 것으로 나타났다(Table 12, Fig. 8). 또한 茵陳清肝湯은 인터페론에 의한 Jak-STAT signaling 활성화를 더욱 촉진하는 것으로 나타났다(Table 13, 14, Fig. 9, 10).

4. Inflammatory cytokines가 인터페론 신호전달계에 미치는 영향 및 이에 대한 茵陳清肝湯의 작용 분석

Inflammatory cytokines이 인터페론 신호전달계에 미치는 영향 및 이에 대한 茵陳清肝湯의 작용을 관찰한 결과, 茵陳清肝湯은 TNF- α , IL-1 β , LPS와 같은 Inflammatory cytokine들에 의한 인터페론 신호전달계 억제를 차단함으로써 인터페론에 의한 antiviral gene expression을 유지시키는 기능이 있는 것으로 나타났다(Table 15, 16, 17, Fig. 11, 12, 13).

Table 12. Activation of Jak-STAT Signaling by IJCGT in HepG2 Cells

	Control	IJCGT ($\mu\text{g/ml}$; 12 h)		
		1	10	50
(target/ β -tubulin ratio)				
Phospho-Jak1	1.00	1.06	0.96	1.06
Phospho-Tyk2	1.00	1.03	1.02	0.99
Phospho-STAT1	1.00	1.05	1.24	1.88

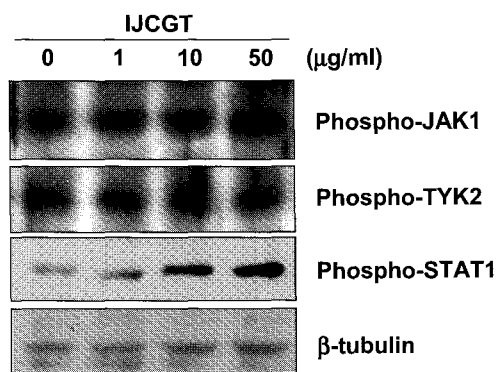


Fig. 8. Activation of Jak-STAT signaling by IJCGT in HepG2 cells.

Table 13. Stimulation of Interferon- α Induced Activation of Jak-STAT Signaling

	Control	IJCGT pretreatment($\mu\text{g/ml}$;12 h)+IFN- α (200U/ml)			
		0	1	10	50
(target/ β -tubulin ratio)					
Phospho-Jak1	1.00	2.67	2.88	3.54	4.88
Phospho-Tyk2	1.00	2.33	2.92	3.39	5.04
Phospho-STAT1	1.00	2.69	2.94	3.58	4.95

Table 14. Stimulation of Interferon- β Induced Activation of Jak- STAT Signaling

	Control	IJCGT pretreatment($\mu\text{g/ml}$;12h) + IFN- β (200 U/ml)			
		0	1	10	50
(target/ β -tubulin ratio)					
Phospho-Jak1	1.00	2.78	2.82	3.59	4.79
Phospho-Tyk2	1.00	2.44	2.56	3.65	4.99
Phospho-STAT1	1.00	2.79	2.80	3.71	5.12

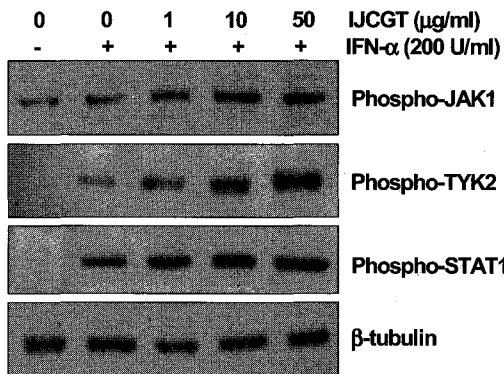


Fig. 9. Stimulation of interferon- α induced activation of Jak-STAT signaling.

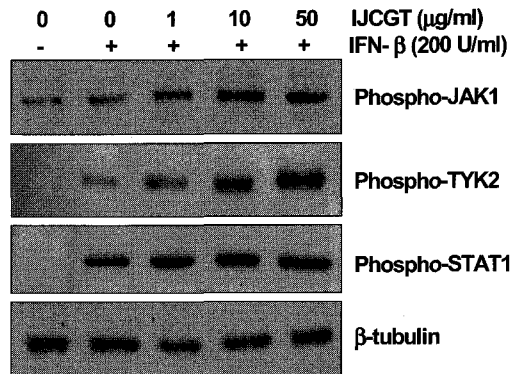


Fig. 10. IJCGT promote the interferon- β induced activation of Jak- STAT signaling.

Table 15. Blockade of Inflammatory Cytokine(TNF- α)-mediated Inhibition of the Interferon Signaling Pathway by IJCGT(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IFN- α (200 U/ml)	TNF- α + IFN- α (20 ng/ml)	TNF- α + IFN- α + IJCGT(50 μ g/ml)
MxA	1.00	2.90	1.32	2.21
2'5'-OAS	1.00	2.92	1.44	2.17

Table 16. Blockade of Inflammatory Cytokine(IL-1 β)-mediated Inhibition of the Interferon Signaling Pathway by IJCGT(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IFN- α (200 U/ml)	IL-1 β + IFN- α (20 ng/ml)	IL-1 β + IFN- α + IJCGT(50 μ g/ml)
MxA	1.00	2.90	1.28	2.19
2'5'-OAS	1.00	2.92	1.31	2.21

Table 17. Blockade of Inflammatory Cytokine(LPS)-mediated Inhibition of the Interferon Signaling Pathway by IJCGT(Quantitative RT-PCR Analysis)

	Control	IFN- α (200 U/ml)	LPS + IFN- α (50 μ g/ml)	LPS + IFN- α + IJCGT(50 μ g/ml)
MxA	1.00	2.90	1.19	2.01
2'5'-OAS	1.00	2.92	1.22	2.09

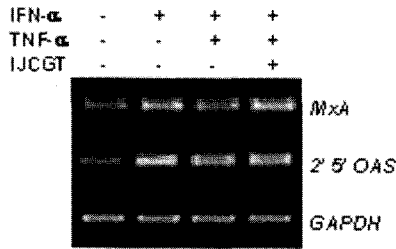


Fig. 11. Blockade of inflammatory cytokine(TNF- α)-mediated inhibition of the interferon signaling pathway by IJCGT(quantitative RT-PCR analysis).

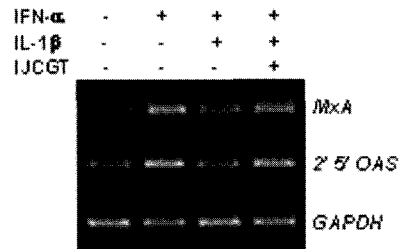


Fig. 12. Blockade of inflammatory cytokine(IL-1 β)-mediated inhibition of the interferon signaling pathway by IJCGT(quantitative RT-PCR analysis).

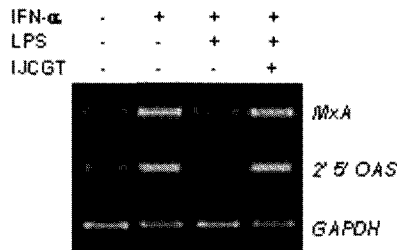


Fig. 13. Blockade of LPS-mediated inhibition of the interferon signaling pathway by IJCGT (quantitative RT-PCR analysis).

V. 考 察

우리나라는 간염 바이러스 특히 B형 간염 바이러스에 의한 만성 간질환의 이환율이 세계적으로 높은 편이고⁴, 한국인 성인에서 C형 간염 바이러스에 대한 Anti-HCV 양성율은 1.0-1.8%미만으로 보고되고 있다²¹⁻³. HCV 감염은 60-85%가 만성으로 진행되고¹, 또 만성 C형 간염 환자 중에서 10-15%는 10-20년 후에 간경변으로 진행된다². 만성 C형 간염 환자들이 20년 후 간암으로 이어질 가능성은 1-5%정도이지만, 간경변이 있을 경우 이 비율은 더 높아진다³. 현재 만성 간질환은 우리나라 40-50대 남성 사망률을 높이는 주요 원인이 되고 있다⁴. 따라서, 다양한 간질환의 원인이 되고 있는 바이러스성 간질환에 대한 보다 효율적인 대책이 필요한 실정이다.

간질환에 대한 최근 연구 동향은 점차 면역학적 개념으로 변해가고 있다. 연구 방법론적으로는 세포

단위의 대사나 apoptosis에 관여하는 단백질이나, DNA, RNA의 활성에 따라 발병 원인과 변화 과정을 상관성을 밝히려 하고 있다^{24,25}.

최근에는 한약의 효능에 대한 분자생물학적 접근이 시도되고 있는데,朴¹⁰은茵陳清肝湯加味方이 Bcl-2, Bcl-xL 활성을 높여 세포사멸을 억제한다고 보고하였고,洪¹¹과高¹²는 각각茵陳清肝湯加味方과茵陳四苓散분획물이 간세포를 보호하고 Cpp32 protease, Fas를 억제하고 Bcl-2를 활성화시켜 apoptosis를 억제한다고 보고하였다.李¹³는茵陳의 분획물 중 butanol fraction에서 Fas를 매개로 하는 apoptosis에 대해 간세포 보호효과가 가장 높다고 하였으며,李¹⁴는茵陳의 butanol fraction은 간세포의 TGF- β 1 induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 세포손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효능을 나타낸다고 보고하였다. 이와 같이 최근에는 항바이러스 작용을 나타내는 유전자 등에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다.

茵陳清肝湯은 淸熱利濕시키는 茵陳四苓散⁷에 수종의 한약재를 가미한 처방으로 임상에서 바이러스성 간질환의 치료에 광범위하게 사용되고 있다. 茵陳清肝湯에 대한 연구로서 禹⁸는 茵陳清肝湯이 만성 B형 간염 환자에서 AST, ALT 등의 혈청학적 개선과 HBeAg의 음전 효과가 있음을 보고하였고, 金²⁶은 안전성에 관한 연구에서 임상용량으로 경구 투여시 어떠한 급성 및 아급성, 만성 경구독성 및 부작용을 나타내지 않았다고 보고하였다. 또, 姜⁹은 茵陳清肝湯이 마우스 간염바이러스와 수침 스트레스로 유발한 마우스의 간경변증에 있어 간기능개선 및 간손상회복에 효과가 있음을 보고하였다.

인터페론은 현재 만성 바이러스성 간염 치료제로 공인받은 약제로^{27,28}, 바이러스성 간염에 쓰여지고 있는 약제이다. 특히 C형 간염에 인터페론 치료를 많이 시행하는데, 인터페론 치료에 대한 반응율은 40%정도 밖에 되지 않고 60%는 인터페론 치료에 대한 반응이 거의 없는 것이 현실이다⁵. 또한, 만성 C형 간염에서 인터페론을 단독 투여할 경우 치료 후의 재발율도 높아서 지속적으로 혈청 ALT수치가 정상적으로 유지되는 예는 전체의 10-20%에 불과하다^{29,31}.

이러한 인터페론 치료의 저항성에 대한 원인은 다양할 뿐 아니라, 명확한 기전은 아직 분명히 밝혀지지 않았지만⁶, 인터페론의 용량을 높이거나 또는 인터페론 알파와 리바비린과 같은 다른 항바이러스제를 함께 투여하는 치료가 이루어지고 있다^{32,4}.

리바비린은 합성 뉴클레오시드 제제(synthetic guanosine analogue)로서 DNA 및 RNA 바이러스에 대해 광범위한 항바이러스 작용을 하는 것으로 알려져 있다³⁵. 리바비린을 만성 C형 간염 환자에 투여하였을 경우 혈청 ALT치의 정상화나 HCV RNA의 수치가 감소되는 것으로 보고되고 있으나, 치료 중단 후 혈청 ALT치가 다시 상승하므로 단독 제제로 사용하는 데는 제약이 있다³⁶⁻⁸. 하지만, 인터페론 알파와 리바비린을 함께 6개월간 투여하여 각각을 단독 사용했을 때보다 지속적인 치료 반응율이 현저하게 상승했다는 보고들이 있어서^{39,41}, 현재는 만

성 C형 간염치료에 표준 치료로 자리 잡고 있다.

Type I 인터페론들(IFN- α , IFN- β , IFN- ω)은 type I IFN receptor와 결합하게 되는데, 이 type I 인터페론의 신호전달계 중에서는, Jak-STAT 신호전달계가 중요한 역할을 한다⁴².

Janus family tyrosine kinase(Jak)-signal transducers and activations of transcription(STAT)은 1992년 IFN- α 또는 IFN- γ 에 대한 반응성을 잃어버린 mutant cell line에서 인터페론에 대한 반응을 회복시켜주는 물질을 선별하는 과정에서 발견됨에 따라, 인터페론의 신호전달매개체로 처음 알려진 물질이다¹⁵. 이후로, Jak-STAT은 다양한 cytokine과 성장인자 및 호르몬의 신호전달과정에서도 작용하고 있음이 밝혀져 왔다^{43,7}.

이 신호전달경로에는 Jak family에 속하는 tyrosine kinase들과 STAT family의 member들인 신호전달인자이면서 전사조절인자로서의 이중적 기능을 갖는 세포질 내 단백질이 main player로서 작용하는데, 일반적인 cytokine과 펩타이드 호르몬들의 세포내 신호전달이 다양한 protein kinase cascade를 통해 다단계로 이루어지는 것에 비해, Jak-STAT경로는 신호전달과정에서 다른 분자들의 참여를 제외 시킴으로써 매우 신속하고 정확하게 특정 ligand-specific response를 유발시킬 수 있는 독특한 신호전달경로로서 주목받고 있다. 이 STAT 신호전달 경로의 가장 큰 특징은 ligand에 의해 새롭게 유도된 STAT-DNA binding activity가 ligand의 자극 후 불과 몇 분만에 핵내에서 관찰될 만큼의 신호전달과정의 신속성이라 할 수 있다. 즉, Jak-STAT경로는 세포막에 가해진 ligand 자극이 receptor/Jak/STAT의 인산화라는 post-translational modification을 이용하여 새로운 단백질의 합성을 요구치 않는 경로를 통하여, 직접 빠르게 핵으로 전달되어 특정 유전자의 전사활성을 조절함으로써 cytokine/hormone의 primary response gene의 발현을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것이다⁴⁸.

Jak family tyrosine kinase는 아미노산 약 1150개로 이루어진 분자량 120-140kDa되는 새로운 그룹의

protein tyrosine kinase로서 지금까지 포유류에서는 Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2의 4종류가 알려져 있다^{49,50}.

Jak1, Jak2 Tyk2는 다양한 종류의 조직에 광범위하게 발견되는 반면, Jak3는 natural killer cell과 thymocyte에 특히 높은 발현도를 나타내며, B cell, T cell, myeloid계열의 세포에서 세포의 활성화에 따라 그 발현이 유도·조절되는 특징이 있다^{51,52}.

인터페론에 저항성을 보이는 다양한 mutant cell line들에 특정 Jak kinase유전자를 전달시켜 줌으로써 인터페론의 항바이러스 효과 및 세포증식억제 효과를 회복시키는 일련의 실험들을 통하여 IFN- α , IFN- β 의 신호전달에는 Jak1과 Tyk2가 요구되는 반면, IFN- γ 의 신호전달과정에는 Jak1과 Jak2가 필수적임이 규명되었다⁵³⁻⁵.

또, STAT1/2는 주로 인터페론의 antiviral action에 그리고 STAT 3/5는 다양한 성장인자와 hormone의 신호 전달 경로에서 세포의 증식과 분화의 조절에 관여하는 경향성이 밝혀져 있다⁵⁶⁻⁸.

간에서 Jak-STAT 신호전달계는 최종적으로 Inter-

feron target gene이면서 항바이러스성 단백질인 myxovirus resistance A(MxA)와 oligoadenylate synthetase(2',5'-OAS)를 활성화시켜 항바이러스 작용을 나타내게 된다¹⁶⁻⁹(Fig. 14).

바이러스 감염시 myxovirus resistance A(MxA)와 oligoadenylate synthetase(2',5'-OAS)는 인터페론에 의해 생성되며 ribonuclease의 생성을 자극하여 인터페론의 항바이러스 작용에 중요한 역할을 한다. 또한 체내에서 인터페론은 미량으로 존재하여 측정이 어렵지만 2',5'-OAS는 비교적 용이하게 검출할 수 있으며, 체내 인터페론 상태를 잘 반영하는 것으로 알려져 있다.

그런데 C형 간염 바이러스가 바로 이 Jak-STAT signaling을 망가뜨리는 것으로 밝혀졌고,^{59,60} 최근의 연구에 따르면 C형 간염 바이러스의 core protein 과 발현에 의해 인터페론에 의해 유도된 STAT1의 활성화가 저해되는 것으로 보고되었다^{61,62}.

임상적으로 다양한 종류의 proinflammatory cytokine들이 알려져 있다. 예를 들면 IL-1 β , IL-6,

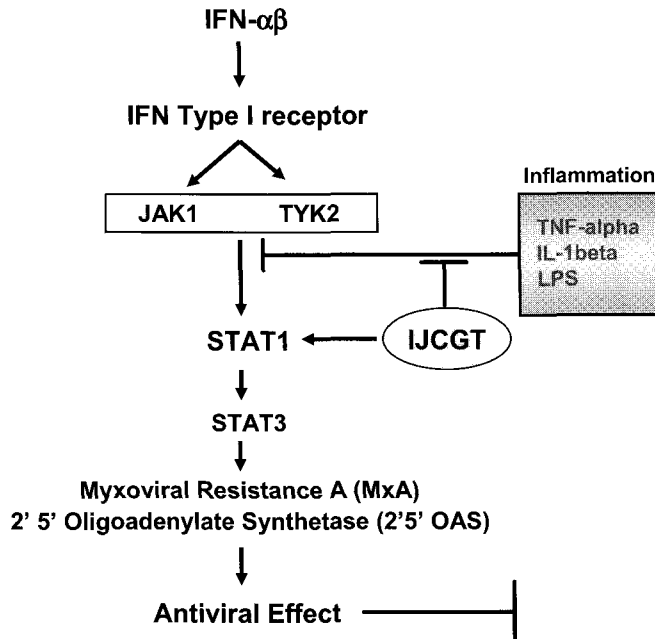


Fig. 14. Interferon signaling pathway(Jak-STAT pathway).

TNF- α 와 같은 cytokine들은 바이러스성 간염⁶³⁻⁵이나 간암⁶⁶ 또는 알콜성 간질환⁶⁷에서 유의성 있게 많이 나타난다. 이러한 proInflammatory cytokine들은 항바이러스 작용과 STAT1의 활성화를 저해시킨다⁶⁸ (Fig. 14).

본 실험에서는 [³H]thymidine incorporation assay를 이용하여 인터페론- α/β 를 각각 0, 50, 100, 200U/ml로 전처리하고, DNA replication을 분석한 결과 인터페론- α/β 는 인체간세포 HepG2의 세포증식에 영향을 미치지 않았지만,茵陳清肝湯 자체는 HepG2의 세포증식을 촉진하는 반면 인터페론의 존재하에서는 세포증식억제 효과를 나타내었다.

Trypan blue exclusion assay결과 인터페론- α/β 는 인체간세포 HepG2의 세포사멸에 큰 영향을 미치지 않았다.茵陳清肝湯은 HepG2 세포의 apoptosis를 억제하는 효과를 보였으나 인터페론에 대한 세포의 반응에는 영향을 미치지 않았다.

인터페론- α/β 를 HepG2에 처리한 결과 MxA와 2'5'-OAS의 mRNA 발현을 유도하여 antiviral 신호전달계를 정상적으로 활성화시키는 것으로 확인되었다.

인터페론- α/β 의 처리 없이茵陳清肝湯만을 투여할 경우에도 처리농도에 비례하여 MxA 및 2'5'-OAS의 mRNA 발현이 증가함이 관찰되었다.또,茵陳清肝湯을 전처리할 경우에는 인터페론- α/β 에 의한 MxA, 2'5'-OAS mRNA 발현이 증가하였다.

茵陳清肝湯은 인터페론- α/β 작용을 매개하는 핵심 신호전달인자인 Jak1, TYK2, STAT1의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 STAT1 protein의 phosphorylation을 증가시킴으로서 STAT1의 활성화를 촉진하였다.반면에,茵陳清肝湯의 전처리는 인터페론에 의한 Jak1, TYK2, STAT1 phosphorylation을 더욱 강화시키는 작용을 나타내었다.

또한, TNF- α , IL-1 β , LPS와 같은 proinflammatory cytokine들은 인터페론에 의한 MxA, 2'5'-OAS mRNA 발현을 억제시키는 작용을 하는데,茵陳清肝湯을 전처리할 경우 이러한 Inflammatory cytokine에 의한 인터페론 신호전달계

억제작용이 완화되었다.

결론적으로茵陳清肝湯은 인터페론 신호전달계의 활성화를 유도하는 기능을 가지고 있으며 특히 Inflammatory cytokines에 의한 인터페론 신호전달계 억제를 완화시킴이 확인되었다. 이는茵陳清肝湯 자체의 STAT1 활성화 기능과 함께 TNF- α 및 IL-1 β 유전자의 발현억제와 연관된 것으로 추정된다. 따라서茵陳清肝湯은 인터페론에 대한 간세포의 감수성을 증가시킴으로서 인터페론의 항바이러스 작용을 촉진할 수 있는 것으로 판단된다.

VI. 結 論

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 인터페론 신호전달계에 미치는 영향을 분석하고자茵陳清肝湯을 HepG2 cell에 전처리하고, 인터페론- α/β 에 의한 MxA, 2'5'-OAS mRNA 발현과 인터페론- α/β 작용을 매개하는 핵심 신호전달인자인 Jak1, TYK1, STAT1의 mRNA 발현 및 활성화를 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1.茵陳清肝湯은 HepG2의 세포증식을 촉진하는 반면 인터페론 α/β 의 존재하에서는 세포증식억제 기능을 활성화시키는 효과를 나타내었다.
- 2.인터페론- α/β 는 인체간세포 HepG2의 세포사멸에 영향을 미치지 않았다.茵陳清肝湯은 HepG2 세포의 apoptosis를 억제하는 효과를 보였으나 인터페론에 대한 세포의 반응에는 영향을 미치지 않았다.
3. HepG2에 인터페론- α/β 를 처리한 결과 MxA와 2'5'-OAS의 mRNA 발현을 유도하였고, 인터페론- α/β 의 처리 없이茵陳清肝湯만을 투여할 경우에도 처리농도에 비례하여 MxA 및 2'5'-OAS의 mRNA 발현이 증가하였으며,茵陳清肝湯의 전처리는 인터페론- α/β 에 의한 MxA, 2'5'-OAS mRNA 발현증가를 더욱 촉진하였다.

4. 茵陳清肝湯은 Jak1, TYK1, STAT1의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 STAT1 protein의 phosphorylation을 증가시킴으로서 STAT1의 활성화를 촉진하였고, 茵陳清肝湯의 전처리인 인터페론에 의한 Jak1, TYK2, STAT1 phosphorylation을 더욱 강화시키는 작용을 나타내었다.
5. TNF- α , IL-1 β , LPS는 인터페론에 의한 MxA, 2'5'-OAS mRNA 발현을 억제시켰으며 茵陳清肝湯을 전처리할 경우 이러한 Inflammatory cytokine에 의한 인터페론 신호전달계 억제작용이 완화되었다.

따라서 茵陳清肝湯은 인터페론에 대한 간세포의 감수성을 유지시킴으로서 인터페론의 항바이러스 작용을 촉진할 수 있는 것으로 판단된다. 또한, 향후 인터페론과 茵陳清肝湯의 병용 투여에 관한 임상 연구도 필요할 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 통계청. 2002년 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2003, p.10, 11, 26.
2. Kim WR. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes Infect*; 2002, p.1219-25.
3. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C. NIH. Consens. State. Sci. Statements. 2002;19:1-46.
4. International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma Study Group. Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a Retrospective Cohort Study Group. *Lancet*. 1998;351:1535-9.
5. J.M. Pawlotsky. Mechanism of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral. Res*. 2003;59:1-11.
6. J.M. Pawlotsky. The nature of interferon-alpha

- resistance in hepatitis C virus Infection. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2003;16:587-592.
7. 장중경. 중경전서. 서울: 대성문화사; 1984, p.225, 240, 249-250, 408, 411.
8. 우홍정. 만성 B형 간염에 대한 茵陳清肝湯의 효과. 제2회 한중학술대회 참가논문집(간장편). 대한한의학협회. 1995, p.18-53.
9. 강경태, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯가미방이 실험적 흰쥐의 간경변증에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1997;20(2):133-50.
10. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯가미방이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(1):145-64.
11. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯가감방이 간세포활성, 세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(2):337-72.
12. 고흥, 이장훈, 우홍정. 인진사령산 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(3):174-85.
13. 이종훈, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 HepG2 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 한방내과학회지. 2000;21(3):363-8.
14. 이지현, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 인체간세포의 TGF- β 1 induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;20(1):53-61.
15. Velazquez et al.: *Cell*. 1992;70:313-22.
16. Chang KC, Hansen E, Foroni L, Lida J, Goldspink G. Molecular and functional analysis of the virus and interferon-inducible human MxA promoter. *Arch. Virol*. 1991;117:1-15.
17. Ronni T, Matikainen S, Lehtonen A, Palvimo J, Dellis J, VanEylen F, et al. The proximal interferon-stimulated response elements are essential for interferon responsiveness: a promoter analysis of the antiviral MxA gene. *J. Interferon Cytokine Res*. 1998;18:773-81.
18. Benech P, Vigneron M, Peretz D, Revel M,

- Chebath J. Interferon-responsive regulatory elements in the promoter of the human 2',5'-oligo(A) synthetase gene. *Mol. Cell. Biol.* 1987;7:4498-504.
19. Wang Q, Floyd-Smith G. The p69/71 2-5A synthetase promoter contains multiple regulatory elements required interferon-alpha-induced expression. *DNA Cell Biol.* 1997;16:1385-94.
20. 지형준. 대한약전 및 대한약전 외 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인덱스사; 1998, p.638.
21. 한상우, 박용욱, 김신목 등. 한국 성인에서 C형 간염 바이러스 항체 양성율에 대한 고찰. *대한내과학회지.* 1994;47:744-8.
22. 권소영, 박이병, 박상훈 등. 한국 성인에서 혈중 C형 간염 바이러스 항체의 발현율과 의의. *대한내과학회지.* 1995;48:361-7.
23. 김건형, 최요안, 민귀환, 안기석, 박찬웅, 김지운. 목포지역에서의 C형 간염 바이러스 항체의 양성율. *대한소화기학회지.* 1996;28:677-82.
24. Leist M, Gartner F, Naumann H, Bluthmann H, Voget K, Brigelrus-Flohe R, et al. Tumor necrosis factor induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. *Gastroenterology.* 1997;112:923-34.
25. Lin D, Fiscella M, O'Connor PO, Jackman JJ, Chen C, Luo Ling L, et al. Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994;91(21):10079-83.
26. 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯의 안전성에 관한 연구. *경희한의대논문집.* 1997;20(1):57-89.
27. Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J: Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B, A meta-analysis. *Ann intern Med.* 1993; 119:312-23.
28. Dusheiko GM. Treatment and prevention of chronic viral hepatitis. *Pharmacol Ther* 1995; 65:47-73.
29. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant alfa. A multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J Med.* 1989;331: 1501-6.
30. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med.* 1997; 336:347-56.
31. Poynare T, Leroy V, Cohard M, et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology.* 1996;24:778-89.
32. Lindsay, KL. Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology.* 1997;26(Suppl.1):71S.
33. Gish, RG. Standards of treatment in chronic hepatitis C. *Semin. Liver Dis.* 1999;19 (Suppl.1):35.
34. Davis, GL. Combination therapy with interferon and Ribavirin as retreatment of interferon relapse in chronic hepatitis C. *Semin. Liver Dis.* 1999;19(Suppl.1):49.
35. Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular mechanisms of action of ribavirin. *Rev Infec Dis.* 1990;12:1139-46.
36. Reichard O, Andersson J, Schvarcz R, Weiland O. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet.* 1991;337:1058-61.
37. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, et al. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 1995;123: 897-903.
38. Dusheiko G, Main J, Thomas H, et al. Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled

- study. *J Hepatol.* 1996;25:591-8.
39. Schalm SW, Hansen BE, Chemello L, et al. Ribavirin enhances the efficacy but not the adverse effects of interferon in chronic hepatitis C. Meta-analysis of individual patient data from European centers. *J Hepatol.* 1997;26:961-966.
 40. Brillanti S, Garson J, Foli M, et al. A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 1994;107:812-7.
 41. Pol S, Couzigou P, Bourliere M, et al. A randomized trial of ribavirin and interferon- α vs. interferon- α alone in patients with chronic hepatitis C who were non-responders to a previous treatment. *J Hepatol.* 1999;31:1-7.
 42. Lalvakolanu DV. Alternate interferon signaling pathways. *Pharmacol. Ther.* 2003;100:1-29.
 43. Ihle JN. Cytokine receptor signaling. *Nature.* 1994;377:591-4.
 44. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell.* 1996;84:331-4.
 45. Darnell JE. Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to Infs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 1994;264:1415-21.
 46. Leonard WJ. Stats and cytokines specificity. *Nature Med.* 1996;2:968-9.
 47. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: Biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:293-322.
 48. 이충훈. Jak-STAT Pathway를 경유하는 Cytokine과 호르몬의 작용기전. *대한내분비학회지* 2003;15(3):367.
 49. Krolewski JJ, Lee R, Shaws TB, Dalla-Favera R. Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene* 1990;5:277-82.
 50. Rane SG, Reddy EP. Jak3 : a novel Jak kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene.* 1994;9:2415-23.
 51. Kawamura M, McVicar DW, Johnston JA, Blake TB, Chen YQ, Lal BK, et al. MOlecular cloning of L-Jak, A Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:6374-8.
 52. Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O, Lai KS, Cwik C, Liu ETe al. Involvement of Jak-3 Janus kinase in signaling by interleukines 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature.* 1994;370:153-7.
 53. Watling D, Guschin A, Muller M, Silvennoinen O, Wittuhn BA, Quelle FW. Complementation by the protein tyrosine kinase Jak2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature.* 1993;366:166-70.
 54. Muller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecke A, Silvennoinen O, et al. The protein tyrosine kinase Jak1 complements defects in interferon-alpha/beta and-gamma signal transduction. *Nature.* 1993;366:129-35.
 55. Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature.* 1993;366:583-5.
 56. Durbin JE, Hacknmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell.* 1996;84:443-50.
 57. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci.*

- 1997;94:3801-4.
58. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 1997;11:179-86.
 59. Heim MH. Intracellular signaling and antiviral effects of interferons. *Dig. Liver. Dis.* 2000;32: 257-63.
 60. Horvath CM, Darnell JE Jr. The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *J. Virol.* 1996;70:647-50.
 61. Blindenbacher A, Duong FH, Hunziker L, Stutvoet ST, Wang X, Terracciano L, et al. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology.* 2003;124: 1462-75.
 62. Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology.* 2004;126:263-77.
 63. Shindo M, Mullin G, Braun-Elwert L, Bergasa N, Jones EA, James SP. Cytokine mRNA expression in the liver of patients with primary biliary cirrhosis(PBC) and chronic hepatitis B(CHB). *Clin. Exp. Immunol.* 1996;105:254.
 64. Llorent, Richaud-Patin LY, Alcocer-Dastillejos N, Ruiz-Soto R, Mercado M, Orozco H. Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *J. Hepatol.* 1996;24: 555.
 65. Mazzella G, Saracco G, Festi D, Rosina F, Marchetto S, Jaboli F, et al. Long-term results with interferon therapy in chronic type B hepatitis: a prospective randomized trial. *Am. J. Gastroenterol.* 1999;94:2246.
 66. Von Schweinitz D, Hadam M, Welte K, Mildenerger H, Pietsch T. Production of interleukin-1 β and interleukin-6 in hepatoblastoma. *Int. J. Cancer.* 1993;12:728.
 67. Diehl AM. Cytokines and the molecular mechanisms of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1999;23:1419.
 68. Zhigang Tian, Xuening Shen, Hong Feng, Bin Gao. IL-1 β Attenuates interferon- α/β -induced Antiviral Activity and STAT1 Activation in the liver: Involvement of Proteasome-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology.* 2000; 165:3959-65.