대한한방내과학회지 제27권 1호(2006년 3월)
Korean J.Orient.Int. Med. 2006;27(1):27-39

# 淸肝解酒湯이 CYP2E1-transfected HepG2 cell에서 알코올유발 세포독성에 미치는 영향

이지은, 이장훈, 김영철, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

# The Effects of *Chungganhaeju-tang(Qingganjiejiu-tang)* on Alcohol induced Cytotoxicity in CYP2E1-transfected HepG2 cells.

Ji-eun Lee, Jang-hoon Lee, Young-chul Kim, Hong-jung Woo

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

**Objectives :** Induction of CYP2E1 by ethanol is believed to be one of the major mechanism by which ethanol generate a state of oxidative stress. 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 *Chungganhaeju-tang* can also protect against alcohol-induced cytotoxicity in CYP2E1-transfected HepG2 cells.

**Materials and Methods :** CYP2E1-transfected HepG2 cells and control vector-transfected HepG2 cells were exposed for isx hours to *Chungganhaeju-tang*, and then 50 mM of ethanol was added and left for two days.

**Results :** Ethanol significantly decreased cell viability in CYP2E1-transfected HepG2 cells and increased apoptosis. These alterations were attenuated by Chungganhaeju-tang. This was accompanied by an improvement of NF-κB and Akt activation.

**Conclusion :** These results suggest that Chungganhaeju-tang exerts inhibitory effect against the cytotoxicity induced by alcohol in CYP2E1-transfected HepG2 cells, and that this is a protective action due, at least in part, to an activation of NF-κB that plays a key role in the protection mechanism, and in reducing hepatotoxic cytokine gene expression.

*Key Words:* *Chungganhaeju-tang(Qingganjiejiu-tang)*, CYP2E1, ethanol, apoptosis, Akt, NF-κB

## Ⅰ. 緖 論

간질환의 원인은 우리나라를 포함한 동양에서는 간염 바이러스에 의한 것이 주원인이었으나, 「2001년 국민건강·영양조사」의 보건의식행태조사에 따르면 우리나라 성인의 위험 음주율 및 고도 위험 음주율은 지속적으로 심각한 수준을 나타내고 있어 이로 인한 간질환의 발생이 현저히 증가하고 있다[1,2].

최근 알코올성 간질환의 발생 기전에 대한 분자 및 세포생물학적 연구들이 진행됨에 따라 새로운 병리기전들이 밝혀지고 있고 그 기전에 이론적 배경을 둔 다양한 치료 방법들이 시도되고 있으나 아직까지 금주와 영양 관리에 따른 대증 요법 이외의 통용되는 치료법은 제시되지 못하고 있는 실정이다[3,4].

淸肝解酒湯은 對金飮子에 茵蔯四苓散을 合方하고 解酒毒의 要藥인 葛根, 赤楊 등을 가미하여 立方한 것으로 임상에서 알코올성 간질환의 치료에 빈용되는 처방이다.

淸肝解酒湯에 대한 연구로는 알코올성 간손상에서 각종 생화학적 지표를 정상화시키고[5,6], 임상증상을 개선시키는 효과가 입증된 바 있으며[6], 최근에는 알코올 대사관련 유전자의 발현과 TNF-α, IL-1β 등

· 접수 : 2006. 2. 10. · 채택 : 2006. 2. 23.
· 교신저자 : 이장훈, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118, Fax. 02-958-9120
E-mail : hjwoo@khu.ac.kr)

사이토카인 발현에 영향을 미치고[7,8], 항산화효소인 glutathione의 생성과 전사조절인자인 NF-κB를 활성화시킴으로써 알코올 유도성 apoptosis를 억제하고 간세포 활성을 높여 간보호 작용이 있으며[9,10], TGF-β1의 합성을 억제하고 fibroblast의 증식과 섬유화 유발 유전자 발현을 억제함이 보고된 바 있다[11].

근래 만성적인 알코올 섭취시 유도되는 CYP2E1 효소 활성이 간손상의 중요 인자로 주목받고 있으며 실험적으로 CYP2E1의 유도가 감소됨으로써 간손상의 정도가 감소되는 것으로 보고되고 있다[12]. 이에 저자는 淸肝解酒湯이 CYP2E1 매개로 일어난 알코올성 간손상에 대해서 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하여, CYP2E1-transfected HepG2 cell에 ethanol과 淸肝解酒湯을 투여하고 세포활성과 apoptosis, Akt와 NF-κB 활성 및 간손상 관련 유전자 발현을 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해[13]에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of Chungganhaeju-tang(CGHJT)

| 韓藥名 | 生藥名 | 用量(g) |
|---|---|---|
| 茵 蔯 | Artemisiae capillaris Herba | 30 |
| 陳 皮 | Aurantii Nobilis Pericarpium | 12 |
| 葛 根 | Puerariae Radix | 12 |
| 赤 楊 | Alny Cortex et Ramulus | 12 |
| 白 朮 | Atractylodis Rhizoma Alba | 8 |
| 茯 苓 | Hoelen | 8 |
| 澤 瀉 | Alismatis Rhizoma | 8 |
| 豬 苓 | Polyporus | 8 |
| 厚 朴 | Magnoliae Cortex | 8 |
| 砂 仁 | Amomi Semen | 6 |
| 甘 草 | Glycyrrhizae Radix | 6 |
| Total amount | | 118 |

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 淸肝解酒湯 1첩 분량(118g)을 3차 증류수 1000㎖에 넣고 2시간씩 2회 환류추출한 후 얻은 전탕액을 면으로 여과하여 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 32.4g의 건조추출물(수율 27.46%)을 얻었다. 얻어진 추출물을 DMEM 배지 110㎖에 더하여 37℃에서 3시간 동안 섞었다. 원심 분리하여 남아있는 시료를 제거한 상층액을 0.45㎛ 필터(Millipore사)로 여과하여 멸균하고 4℃에 저장하였다.

### 2. 방법

1) 세포배양

인체 간암세포주 HepG2 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockvelle, MD)에서 구입하여 DMEM 90%와 fetal bovine serum 10% 혼합배지를 이용하여 5%의 $CO_2$ 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

2) 간세포에 대한 검액의 처리

淸肝解酒湯의 인체간세포에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 6 well plate에 $1\times10^5$/well의 밀도로 배양한 후 淸肝解酒湯을 1, 10, 50, 100㎍/ml의 농도로 12, 24, 48시간동안 처리하였다. 알코올이 유발하는 세포독성에 대한 淸肝解酒湯의 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell에 50mM의 알코올(95%, Sigma-Aldrich)을 24, 48, 72시간동안 처리하였다. 대조군 및 약물이 처리된 세포는 0.1% trypsin-EDTA을 이용하여 회수하여 total RNA를 추출하였으며 정량적 RT-PCR 분석을 이용하여 각 유전자의 mRNA 발현양상을 비교분석하였다.

3) CYP2E1 expression vector의 제작 및 transfection

CYP2E1을 발현시킬 수 있는 expression vector의 제작을 위하여 CYP2E1 유전자의 protein-encoding region을 클로닝 하였다. PCR을 이용한 클로닝을 위하여 primer 5'-CAGCAGGGCCCCAGCGCACCATGTC-3'(sense)와 5'-TTCAGGGTGACCTCCACTCACTCATG-3'(antisense)를 사용하였다. PCR 산물은 pCR

2.1-TOPO vector(Invitrogen, San Diego, CA)를 이용하여 일차적으로 클로닝한 후 이를 다시 pcDNA3.1-His6-V5 vector (Invitogen)에 클로닝 하였다. 클로닝의 방향성 및 염기서열의 정확성 여부는 제작된 expression vector의 DNA sequencing을 통하여 확인하였다. Expression vector의 HepG2 cell에의 transfection은 FuGene6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)을 이용하여 수행하였다. 즉, $1\times10^5$cells/well에 3μg의 expression plasmid 또는 empty vector와 3μl의 Fu Gene6을 혼합하여 transfection을 수행하였으며 유전자의 발현여부는 형광현미경을 이용하여 확인하였다. CYP2E1의 transfection으로 인한 HepG2 cell의 활성저하는 관찰되지 않았다.

4) MTT 반응실험

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT 5㎎/㎖을 PBS에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22㎛의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1×105개의 세포를 포함하고 있는 100㎕의 cell suspension에 10㎕의 MTT stock solution을 첨가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37℃에서 3시간 보존한 후 100㎕의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals를 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570㎚에서 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) reader로 OD (optical density)를 측정하였다.

5) Trypan blue exclusion assay

세포사멸률을 측정하기 위해서 trypsin-EDTA로 떼어낸 세포를 원심 분리하여 cell pellete를 얻은 후, 이를 다시 cold PBS(phosphate buffered saline)에서 $5\times10^5$cells/㎖가 되도록 재현탁하였다. 슬라이드에 0.5㎖ suspension을 준비하고, Trypan blue solution으로 염색한 후 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 현미경으로 dead cell을 계수하여 총세포수와의 비를 계산하였다.

6) NF-κB 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 원심 하였으며 100μl의 low salt buffer (20mM Hepes, pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM NaVO4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.2% Nonidet P-40, 10% glycerol, supplemented with a set of proteinase inhibitors, CompleteTM)를 이용하여 resuspension 하였다. Cell suspension을 얼음 위에 약 10분간 방치시킨 후 13,000 ×g로 2분간 원심 분리하여 supernatants (cytosolic extracts)를 취하였으며 즉시 dry ice/ethanol bath에 보관하였다. Pelleted nuclei는 60μl의 high salt buffer (20mM Hepes, pH 7.9, 420mM NaCl, 10mM KCl, 0.1 mM NaVO4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% glycerol, supplemented with CompleteTM)로 resuspension 한 후 protein 추출을 위해 약 30분간 shaking 하였다. 이를 13,000 ×g로 10 분간 원심분리한 후 supernatants를 취하였다. 분리된 핵질과 세포질의 순도는 U1 SnRNP 70과 beta-tubulin에 대한 immunoblotting을 통하여 각각 검증하였다.

7) Immunoblotting Assay

Lysis buffer[20mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5mM sodium phosphate, 1mM beta-glycerolphosphate, 1mM Na3VO4, 1mM PMSF]를 이용하여 세포를 용해시킨 후 원심 분리하여 단백질을 분리하였다. 약 20μg의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 하였으며 CYP2E1-specific, Akt-specific, NF-κB(p65)-specific 및 tubulin-specifc antibody(SantaCruz biotechnology)를 이용하여 Western blot을 수행하였다. Antibody binding은 enhanced chemiluminescence(Amersham Pharmacia Biotech) 방법을 통해 검출하였으며 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 사용하였다.

8) 정량적 RT-PCR 분석

(1) RNA의 추출

250g의 guanidine isothiocyanate을 293㎖의 3차 증류수에 넣은 후 여기에 0.75M sodium citrate 17.6㎖와 10% sarkosyl 26.4㎖를 넣어 65℃에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다. 제작된 GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 넣어 solution D를 준비하였다. $1\times10^5$의 세포에 solution D 500㎕, 2M sodium acetate (pH4.0) 50㎕를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500㎕, chloroform:isoamyl 알코올 (24:1) 100㎕를 넣어 10초간 vortexing하여 얼음에 15분간 방치하였다. 혼합용액을 15000RPM에서 20분간 원심 분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000㎕를 넣어 -70℃에서 24시간 침전시켰다. 15000RPM에서 20분간 원심 분리하여 용액을 제거한 후 RNA 침전물을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30㎕의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

(2) cDNA의 제작

Reverse transcriptase buffer 2㎕, Random hexamer(10pM) 1㎕, AMV-RT(10U/㎕) 1㎕, dNTP(10pM) 1㎕, RNase inhibitor 0.5㎕, RNA 1㎍를 혼합한 후 20㎕가 되도록 sterile water를 첨가하여 25℃에서 10분간 방치한 후 42℃에서 15분, 95℃에서 5분간 처리하였다.

(3) Primer의 제작

House keeping gene인 GAPDH(Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase)와 target genes인 TNF-α, IL-1β, IL-6, TGF-β1, Collagen 1α의 primers를 사용하였다.

(4) Quantitative PCR

준비된 cDNA 4㎕에 10X amplification buffer 10㎕, Tag polymerase 1unit, dNTP(10pM) 5㎕, primer 1(10pM) 2㎕, primer 2(10pM) 2㎕, D.W.를 합하여 total 100㎕ 분량으로 만든 후 다음의 조건으로 36~40 cycles PCR 반응을 시행하였다.

a. First cycle

| | |
|---|---|
| Denaturation | 5 min at 94℃ |
| Annealing | 1 min at 59℃ |
| Polymerization | 1 min at 72℃ |

b. Subsequent cycle (34-38 cycles)

| | |
|---|---|
| Denaturation | 1 min at 94℃ |
| Annealing | 1 min at 59℃ |
| Polymerization | 1 min at 72℃ |

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

| Gene | Primer | | Nucleotide sequences |
|---|---|---|---|
| GAPDH | S | Sense | 5'-TGACTGTCCGATTGTCAATCCAGGCT-3' |
| | AS | Antisense | 5'-GACATGGATCCCACGAAATCTAGCGAC-3' |
| TNF-α | S | Sense | 5'-GATCCAGCGACTGCATCGAGATCCTC-3' |
| | AS | Antisense | 5'-TGCGCTAGTTGACAATCGAATGCCGCT-3' |
| IL-1β | A | Sense | 5'-GACAGCTAAGAGAGCTTTGACGCCTC-3' |
| | AS | Antisense | 5'-AACGACTGATTGGGACACTACAGAGAG-3' |
| IL-6 | S | Sense | 5'-TTATCACGACAGCTAGAGTCGGGCGCT-3' |
| | AS | Antisense | 5'-CGCGGGCATCTATCATCTATTCGACGG-3' |
| TGF-β1 | S | Sense | 5'-CACTTGCAGGAGCGCACGATCATG-3' |
| | AS | Antisense | 5'-TTTCCTGCTTCTCATGGCCACCCC-3' |
| Collagen 1α | COL-S | Sense | 5'-AGCAGACGGGAGTTTCTCCTCG-3' |
| | COL-AS | Antisense | 5'-ACCTTGCCGTTGTCGCAGACGC-3' |

c. Last cycle

| | |
|---|---|
| Denaturation | 1 min at 94℃ |
| Annealing | 1 min at 59℃ |
| Polymerization | 10 min at 72℃ |

PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 20분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 정량화하였다. 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 ±20%내로 정량화 하였다. 위의 결과를 바탕으로 target 유전자에 대한 PCR반응을 시행하여 상대적인 정량화를 시행하였다.

## III. 結 果

### 1. CYP2E1 expression vector의 transfection

HepG2 cell을 배양($1\times10^5$cells/well)한 후, CYP2E1 expression vector의 transient transfection(0.5, 1, 2 μg)을 시행하였으며 transfection 72시간 후 RNA 및 protein 추출하여 CYP2E1 발현여부 확인을 위한 정량적 RT-PCR 및 Western blot assay를 시행하였다. Expression vector의 transfection 양에 따라 CYP2E1 mRNA가 발현됨이 관찰되어, transient transfection을 통해 HepG2 cell에서 CYP2E1 발현이 성공적으로 유도되었음을 확인하였다(Table 1, Table 2, Fig. 1, Fig. 2).

### 2. CYP2E1 유전자의 transfection이 HepG2 cell의 viability에 미치는 영향

淸肝解酒湯의 영향에 대한 실험에 앞서 expression vector의 transfection이 세포에 야기할 수 있는 화학적 또는 물리적 스트레스가 세포활성에 영향을 미치는 가를 파악하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. Transfection 24, 48, 72 시간 후 MTT assay를 시행하여 세포활성의 변화를 분석하였다. 세포활성의 측정은 2회에 걸쳐 반복 수행하였다. CYP2E1 expre-

Table 1. Induction of CYP2E1 Expression in HepG2 Cells(Quantitative RT-PCR Analysis)

| | Control | Vector-transfected | CYP2E1-transfected | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Vector conc.(μg) | 0 | 2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| CYP2E1 level (CYP2E1/GAPDH) | 0.00 | 0.00 | 0.46 | 1.02 | 2.82 |

Table 2. Induction of CYP2E1 Expression in HepG2 Cells(Western Blot Analysis)

| | Control | Vector-transfected | CYP2E1-transfected | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Vector conc.(μg) | 0 | 2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| CYP2E1 level (CYP2E1/Tubulin) | 0.00 | 0.00 | 0.52 | 1.64 | 3.42 |

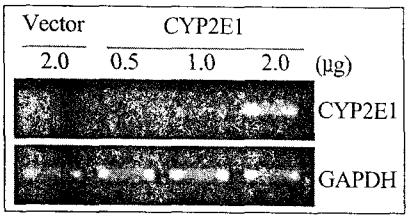


Fig. 1. Induction of CYP2E1 expression in HepG2 cells (Quantitative RT-PCR analysis)

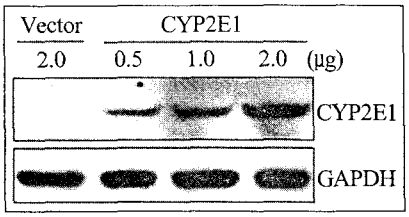


Fig. 2. Induction of CYP2E1 expression in HepG2 cells (Western blot analysis)

ssion vector의 transfection은 HepG2 cell의 활성에 큰 변화를 야기하지 않음을 확인할 수 있었다(Table 3).

### 3. 알코올에 의한 세포활성저하와 CYP2E1 발현과의 관계에 대한 분석

CYP2E1의 발현량에 따라 알코올에 의한 세포활성 저하가 관찰되는지 확인하기 위해 HepG2 cell($1\times10^5$ cells/well)에 CYP2E1 expression vector의 transient transfection(0.5, 1, 2㎍)을 시행한 후, transfection 24시간 후 ethanol(50mM)을 투여하였다. Ethanol 투여 48시간 후 MTT assay를 시행하여 세포활성을 측정하였으며 세포활성의 측정은 3회에 걸쳐 반복 수행하였다. 그 결과, ethanol이 투여되지 않는 상태에서는 CYP2E1 발현량이 세포활성에 영향을 미치지 않았다. 그러나 ethanol 투여시에는 CYP2E1의 발현량에 비례하는 세포활성의 저하가 관찰되어, CYP2E1이 알코올성 세포독성 유발에 중요한 역할을 한다는 기존의 연구보고를 확인하였다(Table 4).

### 4. CYP2E1에 의한 알코올성 세포독성유발에 淸肝解酒湯이 미치는 영향 - I

HepG2 cell($1\times10^5$cells/well)에 CYP2E1 expression vector의 transient transfection(0.5, 1, 2㎍)을 시행하여, transfection 24시간 후 淸肝解酒湯(50㎍/ml)을 투

Table 3. Effect of CYP2E1 Transfection on Cell Viability(MTT Assay)

| | Control | Vector-transfected | CYP2E1-transfected | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Vector conc.(㎍) | 0 | 2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| 1st | 0.504 | 0.492 | 0.496 | 0.490 | 0.498 |
| 2nd | 0.486 | 0.490 | 0.488 | 0.486 | 0.488 |

Table 4. Effect of CYP2E1 Expression on Cell Viability in Cells Treated with Ethanol(MTT Assay)

| | | Control | Vector-transfected | CYP2E1-transfected | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vector conc.(㎍) | | 0 | 2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| (-) Ethanol(50mM) | 1st | 0.498 | 0.504 | 0.488 | 0.494 | 0.496 |
| | 2nd | 0.506 | 0.496 | 0.496 | 0.494 | 0.498 |
| | 3rd | 0.502 | 0.504 | 0.498 | 0.494 | 0.490 |
| (+) Ethanol(50mM) | 1st | 0.346 | 0.360 | 0.344 | 0.266 | 0.202 |
| | 2nd | 0.362 | 0.356 | 0.336 | 0.260 | 0.192 |
| | 3rd | 0.338 | 0.340 | 0.334 | 0.250 | 0.198 |

Table 5. Effect of CGHJT on Ethaonl Induced Cell Toxicity in CYP2E1-transfected HepG2 Cells(MTT Assay)

| | | | Vector-transfected | CYP2E1-transfected | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vector conc.(㎍) | | | 2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| Treated | Untreated control | 1st | 0.502 | 0.500 | 0.494 | 0.498 |
| | | 2nd | 0.496 | 0.498 | 0.500 | 0.496 |
| | CGHJT(50㎍/ml) only | 1st | 0.524 | 0.518 | 0.508 | 0.506 |
| | | 2nd | 0.518 | 0.516 | 0.510 | 0.500 |
| | Ethanol(50mM) only | 1st | 0.362 | 0.356 | 0.256 | 0.196 |
| | | 2nd | 0.364 | 0.358 | 0.246 | 0.206 |
| | CGHJT+Ethano | 1st | 0.468 | 0.390 | 0.382 | 0.428 |
| | | 2nd | 0.462 | 0.386 | 0.380 | 0.436 |

여하였다. 淸肝解酒湯 투여 6시간 후 ethanol(50mM)을 투여하였으며, ethanol 투여 48시간 후 MTT assay를 시행하였다. 세포활성의 측정은 2회에 걸쳐 반복 수행하였다. 관찰 결과 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 알코올성 세포독성증가를 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다(Table 5).

5. CYP2E1에 의한 알코올성 세포독성유발에 淸肝解酒湯이 미치는 영향 - II

淸肝解酒湯의 농도에 따른 알코올성 세포독성에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 HepG2 cell($1\times10^5$ cells/well)에 CYP2E1 expression vector의 transient transfection(2㎍)을 시행하였으며, transfection 24시간 후 농도별로 淸肝解酒湯을 투여(1, 10, 50, 100㎍/ml)하였다. 淸肝解酒湯 투여 6 시간 후 ethanol(50mM)을 투여하였으며, ethanol 투여 48시간 후 2차례에 걸쳐 MTT assay를 시행하였다. 그 결과, 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 알코올성 세포독성증가를 투여농도에 따라 감소시킴을 확인하였다(Table 6).

6. 淸肝解酒湯이 CYP2E1에 의한 알코올성 apoptosis 촉진에 미치는 영향

淸肝解酒湯의 농도에 따른 알코올성 apoptosis에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 HepG2 cell($1\times10^5$ cells/well)에 CYP2E1 expression vector의 transient transfection(2㎍)을 시행하였으며, transfection 24시간 후 농도별로 淸肝解酒湯을 투여(1, 10, 50, 100㎍/ml)하였다. 淸肝解酒湯 투여 6 시간 후 ethanol(50mM)투여하였으며, ethanol 투여 48시간 후 2회에 걸쳐 Tryphan blue exclusion assay를 시행하였다. 그 결과, 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 알코올성 apoptosis를 투여농도에 따라 감소시킴을 확인하였다(Table 7).

7. 淸肝解酒湯이 CYP2E1 발현 HepG2 cell의 Akt 활성(Akt 인산화)에 미치는 영향

HepG2 cell($1\times10^5$cells/well)에 CYP2E1 expression vector의 transient transfection(0.5, 1, 2㎍)을 시행하였으며, transfection 24시간 후 淸肝解酒湯(50㎍/ml)을 투여하였다. 淸肝解酒湯 투여 6시간 후 ethanol

Table 6. Dose Dependent Effect of CGHJT on Ethaonl Induced Cell Toxicity in CYP2E1-transfected HepG2 Cells(MTT Assay)

| | | Vector-transfected(2㎍) | | | | | CYP2E1-transfected(2㎍) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CGHJT(㎍/ml) | | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 |
| (-) Ethanol | 1st | 0.498 | 0.502 | 0.498 | 0.512 | 0.516 | 0.502 | 0.496 | 0.496 | 0.498 | 0.500 |
| | 2nd | 0.502 | 0.496 | 0.496 | 0.510 | 0.518 | 0.496 | 0.492 | 0.498 | 0.494 | 0.498 |
| (+) Ethanol | 1st | 0.350 | 0.378 | 0.416 | 0.460 | 0.478 | 0.204 | 0.242 | 0.348 | 0.448 | 0.466 |
| | 2nd | 0.356 | 0.380 | 0.418 | 0.420 | 0.480 | 0.198 | 0.238 | 0.352 | 0.446 | 0.462 |

Table 7. Dose Dependent Effect of CGHJT on Ethaonl Induced Apoptosis in CYP2E1-transfected HepG2 Cells(Tryphan Blue Exclusion Assay)

| | | Vector-transfected(2㎍) | | | | | CYP2E1-transfected(2㎍) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CGHJT(㎍/ml) | | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 | 0 | 1 | 10 | 50 | 100 |
| (-) Ethanol | 1st | 38 | 36 | 38 | 27 | 25 | 36 | 34 | 39 | 30 | 26 |
| | 2nd | 31 | 32 | 31 | 21 | 16 | 34 | 28 | 27 | 24 | 20 |
| (+) Ethanol | 1st | 138 | 118 | 87 | 72 | 60 | 215 | 188 | 125 | 103 | 82 |
| | 2nd | 129 | 112 | 84 | 70 | 59 | 226 | 199 | 137 | 109 | 81 |

(50mM) 투여하였으며, ethanol 투여 48시간 후 Western blot assay를 시행하였다. 관찰 결과 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 Akt 활성(인산화) 감소를 회복시키는 효과를 가지고 있음을 확인하였다(Table 8, Fig. 3).

8. 淸肝解酒湯이 CYP2E1 발현 HepG2 cell의 NF-κB 활성에 미치는 영향

HepG2 cell($1\times10^5$cells/well)에 CYP2E1 expression vector의 transient transfection(0.5, 1, 2㎍)을 시행한 후, transfection 24시간 후 淸肝解酒湯(50㎍/ml)을 투여하였다. 淸肝解酒湯 투여 6 시간 후, ethanol(50mM) 투여하였으며 ethanol 투여 24시간 후 세포를 회수하여 분석하였다

그 결과 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 NF-κB 비활성화를 회복시키는 효과를 가지고 있음을 확인하였다(Table 9).

9. 淸肝解酒湯이 CYP2E1 발현 HepG2 cell의 알코올성 간손상 관련 유전자 발현에 미치는 영향

HepG2 cell($1\times10^5$cells/well)에 CYP2E1 expression vector의 transient transfection(2μg)을 시행하였으며,

Table 8. Effect of CGHJT on Akt Activation in CYP2E1-transfected HepG2 Cells Treated with Ethanol(Western Blot Assay)

| | | Untransfected | Vector-transfected | CYP2E1-transfected | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vector conc.(μg) | 0 | 2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| | Untreated control | 1.00 | 1.02 | 0.92 | 0.84 | 0.76 |
| Treated | CGHJT(50㎍/ml) only | 1.46 | 1.52 | 1.18 | 1.12 | 1.06 |
| | Ethanol(50mM) only | 0.82 | 0.78 | 0.68 | 0.46 | 0.20 |
| | CGHJT+Ethano | 1.18 | 1.24 | 0.78 | 0.86 | 0.96 |

; Each value represents relative ratio of phospho-Akt/tubulin.

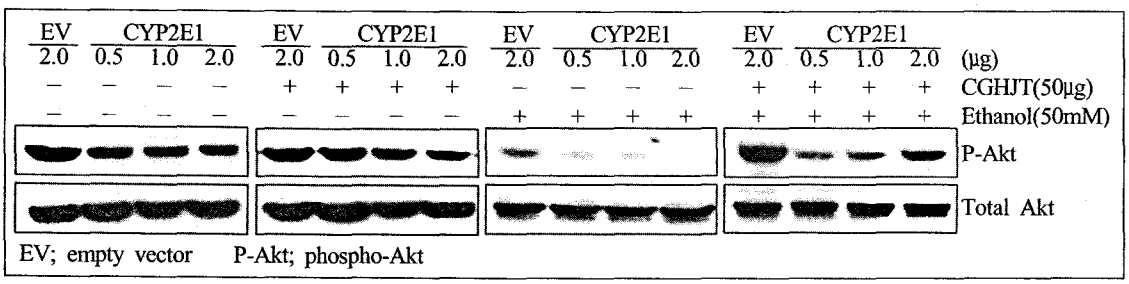


Fig. 3. Effect of CGHJT on Akt activation in CYP2E1-transfected HepG2 cells treated with ethanol(Western blot assay)

Table 9. Effect of CGHJT on NF-κB Activation in CYP2E1-transfected HepG2 Cells Treated with Ethanol(Western Blot Assay)

| | | Untransfected | Vector-transfected | CYP2E1-transfected | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Vector conc.(μg) | 0 | 2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| | Untreated control | 1.00 | 1.00 | 0.96 | 0.90 | 0.80 |
| Treated | CGHJT(50㎍/ml) only | 1.24 | 1.18 | 1.16 | 1.16 | 1.10 |
| | Ethanol(50mM) only | 0.94 | 0.96 | 0.84 | 0.70 | 0.56 |
| | CGHJT+Ethano | 1.22 | 1.20 | 0.82 | 0.96 | 1.04 |

; Each value represents relative ratio of nuclear NF-κB/cytoplasmic NF-κB.

transfection 24시간 후, 淸肝解酒湯을 투여(50μg/ml)하였다. 淸肝解酒湯 투여 6시간 후 ethanol(50mM) 투여하였으며, ethanol 투여 24시간 후 세포를 회수하여 RNA 추출 및 cDNA 합성, quantitative RT-PCR, 전기영동, densitometric analysis를 통해 target gene/GAPDH 비율(expression level)을 분석하였다. 그 결과, 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의해 발현이 증가하는 알코올성 간손상 관련 유전자인 TNF-α, TGF-β1, IL-1β, Collagen-1α에 대하여 뚜렷한 억제 효과가 있음을 확인하였다(Table 10).

## Ⅳ. 考 察

간질환은 2004년 사망원인통계에 따르면 우리나라 사망원인 6위이며 40~50대 남성에서는 암 다음으로 사망률이 높아 중년이후 남성의 건강을 위협하는 대표적인 질환 중 하나이다[14]. 여성보다 남성에서 간질환의 위험이 큰 것은 알코올 등의 위험 요인에 남성이 더 많이 노출되어 있기 때문이라는 추측이 있으며, 근래 우리나라에서도 간질환에서 알코올성 간질환의 비중이 현저히 증가하고 있다[1,2,14]. 그러나 이러한 알코올성 간질환의 증가에도 불구하고 현재 알코올성 간질환에 금주와 영양 관리의 대증요법 외의 치료법은 없는 실정이다[3,4].

알코올성 간손상의 병인은 아직 완전히 규명되지 못한 상태이다. 알코올은 하나의 직접적인 간독성 물질이지만 알코올 섭취는 최종 간독성 반응에 영향을 미치기까지 다양한 대사반응을 주도한다. 최근 알코올성 간질환의 발생 기전에 대해 분자 및 세포생물학적 연구들이 진행됨에 따라 새로운 병리기전들이 밝혀지고 있다. 그 중에서도 세포사멸(apoptosis)은 알코올성 간손상의 중요한 기전으로 주목받고 있으며 조직염증과 괴사, 섬유화에 있어서 핵심적인 기전으로 점차 인식되고 있다. 알코올에 의한 간세포의 사멸기전은 산화 스트레스(oxidative stress)와 death-receptor가 연관되는 기전이 관여할 것으로 알려져 있다. 만성적인 알코올 투여에 의해 cytochrome P450 2E1(CYP2E1)이 유도되면 이 효소에 의해 reactive oxygen intermediate들이 과량 생성되고 이들은 미토콘드리아의 기능부전을 초래하여 cytrochrome c와 같은 세포사멸 촉진 인자들이 미토콘드리아로부터 세포질로 배출되게 되며 연쇄적으로 caspase의 활성화를 초래하여 결국 세포사멸이 일어나게 된다. 또 다른 기전으로는 death-receptor와 리간드가 관여하는 것으로 특히 Fas/Fas 리간드와 TNF receptor 1/TNF-α이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[15,16].

CYP2E1은 장기간 음주에 의해 유도되는 물질로 알코올대사에서 MEOS(microsomal ethanol oxidizing system) 대사의 필수 효소이다. 만성적인 음주자의 경우 CYP2E1의 농도가 비음주자에 비해 4~10배 높으며 그 mRNA 발현이 높다는 보고가 있다[17,18]. CYP2E1의 유도에 의한 자유라디칼의 형성과 이로 인한 산화 스트레스는 알코올성 간손상의 중요한 기전으로 주목받고 있는데, 산화 스트레스는 지질 과산화(lipid peroxidation)와 막손상을 일으키며 또한 proinflammatory cytokine인 TNF-α 등의 생산을 증가

Table 10. Effect of CGHJT on Gene Expression Associated with Cell Toxicity in CYP2E1-transfected HepG2 Cells Treated with Ethanol(RT-PCR Assay)

| | Vector-transfected(2μg) | | | | CYP2E1-transfected(2μg) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ethanol (50mM) | − | + | − | + | − | + | − | + |
| CGHJT (50μg/ml) | − | − | + | + | − | − | + | + |
| TNF-α, | 1.00 | 2.48 | 0.96 | 1.68 | 1.26 | 3.62 | 0.98 | 1.72 |
| TGF-β1 | 1.00 | 3.06 | 0.52 | 1.52 | 1.18 | 3.68 | 0.56 | 1.64 |
| Collagen-1α, | 1.00 | 1.86 | 0.92 | 1.38 | 1.30 | 3.62 | 1.04 | 1.44 |
| IL-1β | 1.00 | 1.82 | 0.88 | 1.44 | 1.14 | 2.28 | 1.06 | 1.50 |

; Each value represents relative ratio of each target gene/GAPDH.

시키는 등의 작용으로 간손상을 일으킨다고 알려져 있다[19].

전술한 바와 같이 CYP2E1의 활성과 간독성은 깊은 관계가 있다고 인정받고 있으며 이러한 연관성을 주목해 실험적으로 CYP2E1의 유도를 감소시킴으로서 간손상의 정도가 감소되었다는 보고가 있다. 그러나 간조직의 손상을 정량화해보면 CYP2E1 억제제는 오직 부분적인 억제효과만을 보여주었다[20,21]. 그 외에도 CYP2E1이 활성화된 상태에서 에탄올에 의한 간손상을 억제하는 약물들에 대한 연구도 진행되고 있으며, 좀 더 효과적인 약물들이 개발되고 있으나 효과적일 뿐 아니라 장기간 사용에도 안심하고 사용할 수 있는 약재 개발의 필요성은 여전히 남아 있다[22-5].

본 실험에서 사용한 淸肝解酒湯은 酒傷의 대표적인 처방으로 濕痰을 제거하는 對金飮子에 淸熱利濕하는 茵蔯四苓散을 合方하고 解酒毒의 要藥인 葛根, 赤楊 등을 加味하여 구성된 方劑이다.

淸肝解酒湯은 동물 실험을 통해, 알코올 대사 과정에서 ADH의 활성을 억제하고, 알코올에 의해 야기된 비정상적 LFT level을 호전시키는 작용이 있음이 검증되었고[5], 임상 실험을 통해서도 알코올성 간손상 환자의 임상 증상 및 LFT level을 호전시키는 작용이 있음이 보고된 바 있다[6]. 또한 에탄올과 아세트알데하이드에 의해 유발된 HepG2 cell의 감소된 세포활성과 세포증식을 증가시키고, apoptosis를 감소시키며 알코올 대사관련 유전자인 ALDH 유전자 발현에는 영향을 미치지 않으나[7], TNF-α, IL-1β의 발현을 감소시키며[8], glutathione의 생성을 촉진하여 apoptosis를 감소시키고[9], NF-κB의 활성화 및 inflammatory cytokine mRNA의 발현 감소를 통하여, kupffer cell에서 ethanol 및 acetaldehyde induced apoptosis를 억제시켜 간보호 효과가 있음이 확인되었다[10]. 최근에는 TGF-β1 합성을 억제하고, fibroblast의 증식과 섬유화 유발 유전자 발현을 억제하는 효과가 있음도 보고된바 있다[11].

본 실험은 淸肝解酒湯이 CYP2E1이 활성화된 상태에서 ethanol로 유도되는 간손상에 대해서 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 시행되었다. HepG2 cell에서는 지속적인 ethanol 투여에도 충분한 CYP2E1의 활성이 유도되지 않기 때문에[26], CYP2E1을 발현시킬 수 있는 expression vector를 제작하여 HepG2 cell에 transfection 시켜 만든 CYP2E1-transfected HepG2 cell와 empty vector-transfected HepG2 cell을 이용하여 실험하였다. CYP2E1의 transfection으로 인한 HepG2 cell의 활성저하는 관찰되지 않았다(Table 1-3, Fig. 1, 2).

실험 결과, 우선 CYP2E1이 발현된 정도에 비례하여 ethanol에 의한 세포활성저하가 empty vector-transfected HepG2 cell에 비해 증가함이 관찰됨으로서 CYP2E1이 알코올성 세포독성 유발에 중요한 역할을 한다는 기존의 연구보고를 확인하였다(Table 4). CYP2E1에 의한 알코올성 세포독성증가에 대해 淸肝解酒湯이 어떠한 영향을 미치는지 MTT assay를 시행하여 살펴본 결과, CYP2E1 발현 증가에 따라 증가하는 알코올성 세포독성에 대해 淸肝解酒湯은 뚜렷한 억제효과를 보였으며, 淸肝解酒湯 투여농도가 50㎍/ml에 이를 때까지 투여농도에 비례하여 억제효과가 증가하였고, 농도 50㎍/ml 이상에서는 비슷한 억제효과를 보였다(Table 5, 6). CYP2E1에 의한 알코올성 apoptosis 촉진에 대해서 Tryphan blue exclusion assay를 시행하여 살펴본 결과, CYP2E1 발현 증가에 따라 empty vector-transfected HepG2 cell에 비해 알코올성 apoptosis가 증가함을 관찰하였고 淸肝解酒湯의 투여 농도에 비례하여 CYP2E1에 의한 알코올성 apoptosis가 감소됨을 확인하였다(Table 7). 이상에서 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 알코올성 간손상에 대해서, 세포활성저하를 회복시키고 apoptosis를 억제하여 간세포에 대한 보호 작용이 있음을 확인할 수 있었다.

淸肝解酒湯의 이러한 간세포 보호효과가 어디서 기인하는지 알아보기 위해 Akt 활성(Akt 인산화)과 NF-κB 활성에 대한 영향을 살펴보았다. 과거 淸肝解酒湯 관련 연구에서도 淸肝解酒湯이 간세포의 apoptosis를 억제하는 과정을 NF-κB가 매개함이 보고된 바 있다[10]. 실험 결과, CYP2E1이 발현된 정도에 비례

하여 ethanol에 의한 Akt와 NF-κB의 활성저하가 empty vector-transfected HepG2 cell에 비해 뚜렷하게 관찰되었고 淸肝解酒湯의 투여가 이러한 활성저하를 억제함을 western blot assay를 통해 확인할 수 있었다(Table 8, 9, Fig. 3).

Akt는 protein kinase B(PKB)라고도 불리는 serine/threonine kinase의 한 종류로서 성장인자나 사이토카인으로부터의 세포 생존 신호전달계에 관여하고, phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)의 하방향(downstream)에 위치하여 PI3K에 의해 조절되고 있는 것으로 알려져 있다[27]. PI3K/Akt 신호전달계의 활성화는 Bcl-xL 유도를 통해 NF-κB의 활성을 일으켜 Fas 리간드 매개의 apoptosis에서 mouse 간세포를 보호하는 효과가 있음이 보고되었고[28], bcl-2군의 발현과는 무관하게 TNF-α 매개의 mouse 간세포 괴사에 대해 보호효과가 있음이 관찰된 바 있다[29].

NF-κB는 면역과 염증반응에 관여하는 유전자의 enhancer 부위에 결합하여 그 유전자의 발현을 조절하는 인자로서, NF-κB/Rel family에 속하는 단백질의 homodimers와 heterodimers로 이루어져 있다. 자극되지 않은 세포에서 NF-κB/Rel 단백은 inhibitor κBs (IκB)라 불리는 억제 단백에 결합되어 세포질 내에 존재한다. 세포가 자극되면 IκB는 수분 내에 인산화 과정을 거치게 되고 이어서 proteosomes에 의해 급격히 분해된다. IκB에서 분리된 NF-κB/Rel 이합체는 핵 내로 이동해 표적유전자의 promotor 부위의 특정 염기 서열에 결합하여 활성화된다. 많은 종류의 자극이 NF-κB를 활성화시킬 수 있는데 이들은 대개 cytokines, protein kinase C를 활성화시키는 자극들, 지질다당질, 산화 스트레스 등이다. NF-κB는 활성화되어 염증 반응을 매개하는 역할을 하기도 하지만, apoptosis를 억제하여 생존에 필수적 인자로 작용하는 것으로 알려져 있으며, NF-κB의 활성화는 TNF-α signaling에 의한 apoptosis에 대항하는 강력한 antiapoptotic signal로 작용한다고 보고된 바 있다[28-32].

산화 스트레스 등에 의한 inflammatory cytokine gene들의 발현 역시 NF-κB 활성화를 통해 매개됨이 알려져 있으므로[30-2], 본 실험에서는 淸肝解酒湯이 NF-κB의 활성화와 관련된 inflammatory cytokine gene을 발현시키는지 알아보고, NF-κB의 활성화가 Akt 활성화와 관계가 있는지 살펴보고자 하였다. 이에 CYP2E1-transfected HepG2 cell와 empty vector-transfected HepG2 cell에 ethanol과 淸肝解酒湯을 투여하여 quantitative RT-PCR, electrophoresis, densitometric analysis를 통해 target gene들의 mRNA 량을 측정하였다. 분석 결과, 淸肝解酒湯은 NF-κB의 활성화를 통해 유도되는 대표적인 inflammatory cytokine 인 TNF-α, IL-1β의 mRNA 발현을 오히려 억제시켰으며, 간손상에서 섬유화에 중요한 작용을 하는 cytokine인 TGF-β1, Collagen-1α의 mRNA 발현도 감소시켰다(Table 10).

따라서, 淸肝解酒湯의 CYP2E1매개 알코올성 apoptosis를 억제하는 기전은 NF-κB의 활성화와 관련된 것으로 보이는데, 이러한 NF-κB의 활성은 Akt 신호전달계의 활성과 관련이 있는 것으로 사료된다. 그리고 淸肝解酒湯에 의한 NF-κB의 활성화가 inflammatory cytokine gene 발현을 감소시켰으며, 그 밖의 간손상 관련 유전자 발현 또한 억제하는 것이 관찰되었다. 이러한 작용을 통해 淸肝解酒湯은 CYP2E1 매개의 알코올성 간손상에서 간세포 보호 작용을 하는 것으로 사료된다.

## Ⅴ. 結 論

淸肝解酒湯이 CYP2E1 매개의 알코올성 간손상에 대해 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 CYP 2E1-transfected HepG2 cell에 ethanol과 淸肝解酒湯을 투여하여 세포활성과 apoptosis, Akt 활성, NF-κB 활성, 간손상 유전자 발현에 대하여 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CYP2E1의 발현량에 따라 알코올 유발 세포활성 저하가 증가함이 관찰됨으로서 CYP2E1이 알코올 유발 세포독성에 중요한 역할을 한다는 기존의 연구보고를 확인하였다.
2. 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 알코올 유발 세포

독성을 처리 농도에 의존적으로 감소시켰다.

3. 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 알코올 유발 apoptosis를 처리 농도에 의존적으로 감소시켰다.
4. 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 Akt 활성(인산화) 감소를 회복시켰다.
5. 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 NF-κB 비활성화를 회복시켰다.
6. 淸肝解酒湯은 CYP2E1에 의한 알코올 간손상 관련 유전자인 TNF-α, TGF-β1, Collagen-1α, IL-1β의 발현 증가를 뚜렷하게 감소시켰다.

이상에서 淸肝解酒湯은 CYP2E1 매개의 알코올성 간손상으로 인한 세포활성저하와 apoptosis를 뚜렷하게 감소시켰으며 이는 Akt 활성화와 NF-κB 활성화, 간손상 관련 유전자 발현 억제 등을 통하여 이루어지는 것으로 보인다.

## 參考文獻


1. 한은경, 박찬일, 이상인. 간경변증의 원인적 분류와 형태학적 특징. 대한병리학회지. 1990;24:412-22.
2. 보건복지부 한국보건사회연구원. 2001년도 국민건강·영양조사 총괄편. 서울: 보건복지부; 2003, p.81-5.
3. Sherlock S, Dooley J. Disease of the liver and biliary system. 11th ed. Oxford: Blackwell Science; 2002, p.381-98.
4. 권영오. 알코올성 간질환의 새로운 치료법과 전망. 대한간학회지. 2003;9(s1):36-45.
5. 곽미애, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올대사 및 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(1):68-76.
6. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지. 2001;22(4):107-13.
7. 김영태, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올 대사관련 유전자 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):123-33.
8. 김병삼, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine발현에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003;24(1):190-201.
9. 윤여광, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 인체간세포의 Glutathione 생성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):81-91.
10. 한창우, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NF-κB 활성화 및 세포사멸에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):59-70.
11. 이지현, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):93-106.
12. Fang C, Lindros KO, Badger TM, Roniss MJJ, Ingelman-Sundberg M. Zonated expression of cytokines in rat liver: effect of chronic ethanol and the cytochrome P450 2E1 inhibitor, chlormethimazole. Hematology. 1998;27:1304-10.
13. 지형준. 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인덱스사; 1998, p.58, 65, 274, 286, 310, 501, 522, 536, 566, 610, 700.
14. 통계청. 2004년 사망원인통계결과. 서울: 통계청; 2005, p.6-8, 21-2.
15. Natori S, Rust C, Stanheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. J Hepatol. 2001;34:248-53.
16. Ishii H, Adachi M, Fernandez-Checa JC, Cederbaum AI, Deaciuc IV, Nanji AA. Role of apoptosis in alcoholic liver injury. Alcohol Clin Exp Res. 2003;27(7):1207-12.
17. Tsutsumi M, Lasker JM, Shimizu M, Rosman AS, Lieber CS. The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver. Hepatology. 1989;10:437-46.
18. Takahashi T, Lasker JM, Rosman AS, Lieber CS. Induction of cytochrome P-450 2E1 in the human liver by ethanol is caused by a correspon-

ding increase in encoding messenger RNA. Hepatology. 1993;17:236-45.

19. Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. Free Rad Biol Med. 1992;12: 219-40.
20. Morimoto M, Hagbjork AL, Nanji AA, Ingelmen-Sundberg M, Lindros KO, Fu PC, et al. Role of cytochrome P450 2E1 in alcoholic liver disease pathogenesis. Alcohol. 1993;10:459-64.
21. Morimoto M, Hagbjork AL, Wan YJY, Fu PC, Clot P, Albano E, et al. Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. Hepatology. 1995; 21:1610-7.
22. Mathew JM, Etheridge AS, Raymer JH, Black JR. Selective inhibition of cytochrome P450 2E1 in vivo and in vitro with trans-1,2-dichloroethylene. Chem Res Toxicol. 1998;11:778-85.
23. Xu Y, Leo MA, Lieber CS. DLPC attenuates alcohol-induced cytotoxicity in HepG2 cells expressing CYP2E1. Alcohol & Alcoholism. 2005; 40(3):172-5
24. Xu Y, Leo MA, Lieber CS. Lycopene attenuates alcoholic apoptosis in HepG2 cells expressing CYP2E1. Biochemical Biophysical Research Communication. 2003;308:614-8.
25. Xu Y, Leo MA, Lieber CS. Lycopene attenuates arachidonic acid toxicity in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. Biochemical Biophysical Research Communication. 2003;303:745-50.
26. Dai Y, Rashba-Step J, Cederbaum AI. Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. Biochemistry 1993;32:6928-37.
27. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev. 1999; 13:2905-27.
28. Hatano E, Brenner DA. Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NF-kappa B activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001;281(6): G1357-68.
29. Imose M, Nagaki M, Naiki T, Osawa Y, Brenner DA, Asano T, et al. Inhibition of nuclear factor kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt is essential for massive hepatocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha in mice. Liver Int. 2003:23:386-96.
30. Baeuerle PA, Baltimore D. NFκB: ten years after. Cell. 1996:87:13-20.
31. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor κB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med. 1997;336:1066-71.
32. French SW, Miyamoto K, Tsukamoto H. Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietaty fat. Alcohol Clin Exp Res. 1986;10(suppl6):13-9.