

茵陳清肝湯이 인체 간암세포의 혈관생성인자 발현에 미치는 영향

김철우, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of Injinchunggan-tang(Yinchenqinggan-tang) on Expression of Angiogenic Factors in HepG2 Cells

Chul-woo Kim, Young-chul Kim, Jang-hoon Lee, Hong-jung Woo

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

Objectives : This study was designed to investigate the effects of Injinchunggan-tang(Yinchenqinggan-tang) on expression of angiogenic factors in HepG2 cells.

Materials and Methods : The mRNA expression levels and protein secretion levels of angiogenic factors were measured using quantitative RT-PCR, Western blot and ELISA assay respectively in Injinchunggan-tang-treated and untreated HepG2 cells.

Results : Injinchunggan-tang(Yinchenqinggan-tang) reduced mRNA expression levels and protein secretion levels of angiogenic factors, especially VEGF, bFGF and TGF- β 1 in HepG2 cells.

Conclusion : Results indicate that Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang) inhibits expression of angiogenic factors in HepG2 cells. Further, results suggest that Injinchunggan-tang (Yinchenqinggan-tang) inhibits angiogenic effects in HCC.

Key Words: Injinchunggan-tang(Yinchenqinggan-tang), HepG2 cell, angiogenic factor, VEGF, bFGF, TGF- β 1

1. 緒 論

우리나라에서 간암은 남자에서 위암, 폐암에 이어 세 번째로 호발하고 여자에서는 여섯 번째로 호발하며¹, 사망원인 역시 인구 10만명 당 22.6명으로 신생물에 의한 사망 중 폐암, 위암에 이어 세 번째로 높은 것으로 보고되고 있다².

간암의 발생기전 및 치료와 관련하여 최근에는 혈관생성과 관련된 연구가 많이 보고되고 있는데, 간세포암 환자에서 vascular endothelial cell growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor(bFGF), trans-

forming growth factor- β 1(TGF- β 1)이 발현된 경우 낮은 생존율을 보였으며, 특히 VEGF가 종양의 크기 및 종양병기와 유의한 연관성이 있음이 밝혀졌다³. 또한 VEGF의 발현 양상이 소간세포암 환자의 예후 및 재발여부를 가늠하는 중요 척도가 될 수 있음이 보고되었다⁴.

혈관형성은 혈관형성 촉진물질과 혈관형성 억제물질 사이의 균형에 의해 결정되는데, 혈관형성 촉진물질로는 VEGF, bFGF, TGF- β , insulin-like growth factor II(IGF-II)가, 혈관형성 억제물질로는 thrombospondin-1(TSP-1)이 대표적으로 알려져 있다⁵.

茵陳清肝湯⁶은 清熱利濕시키는茵陳四苓散⁷에 地榆 覆盆子 蘿蔔子 靑皮 등을 가미한 처방으로 안전성 시험과 간질환의 임상 효과에 대한 검증을 거쳐 임상에서 急慢性 肝疾患의 치료에 폭넓게 사용되고 있다⁸⁻¹⁰.

· 접수 : 2006. 2. 10. · 채택 : 2006. 2. 27.
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118, Fax. 02-958-9120
E-mail : hjwoo@khu.ac.kr)

최근에는 茵陳清肝湯의 효능에 대한 분자생물학적 연구로 茵陳清肝湯과 茵陳四苓散 및 茵陳의 분획물로 세포사멸을 억제하며, 간세포를 보호하는 효과가 있음이 보고되었다¹¹⁻⁵. 또한 茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의해 유발되는 apoptosis로부터 간세포를 보호하고, 인터페론의 항바이러스 작용을 촉진할 수 있음이 보고되었다^{16,17}.

茵陳清肝湯의 항암효과에 관한 연구로는, 茵陳清肝湯이 HepG2.2.15 cell의 증식과 DNA 합성 억제 및 HBV-X gene의 MAP kinase 인산화 억제 작용을 통해 HBV로 인한 간암발생을 억제하는 효과가 있음이 보고된 바 있다¹⁸.

이에 저자는 茵陳清肝湯이 인체 간암세포의 혈관생성인자 발현에 미치는 작용을 구체적으로 살펴보고자 茵陳清肝湯을 HepG2 cell에 전처리하고, 혈관생성인자 VEGF, bFGF, TGF- β , IGF-II, TSP-1의 mRNA 및 단백질 발현을 관찰한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹⁹에 근거하여 경희의료원 한방병원

Prescription of Injinchunggan-tang(IJCGT)

構成藥物	生藥名	用量(g)
茵陳	Artemisiae Capillaris Herba	50
地榆(炒黑)	Sanguisorbae Radix	15
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma Alba	12
豬苓	Polyporus	12
茯苓	Hoelen	12
覆盆子	Rubi Fructus	12
澤瀉	Alismatis Rhizoma	8
蘿藦子	Raphani Semen	8
青皮	Aurantii Immatri Pericarpium	6
甘草	Glycyrrhizae Radix	6
生薑	Zingiberis Rhizoma	12
Total Amount		153

약제과에서 입선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 왼쪽과 같다.

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료(612g)를 3차 증류수(4.8 l)로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80°C 물 중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 70.6g의 건조추출물(수율 11.48%)을 얻었다.

2. 방법

1) 인체 간세포에 대한 검액의 처리

茵陳清肝湯이 혈관생성인자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 세포를 1×10^5 /well의 밀도로 배양한 후 茵陳清肝湯을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 6, 12, 24, 48 시간 처리하였다. 茵陳清肝湯을 처리한 HepG2 세포와 처리하지 않은 세포(대조군)는 0.1% trypsin-EDTA로 회수하였으며 유전자 발현을 분석하기 위하여 protein 및 RNA를 추출하였다. 또한 hypoxic chamber를 사용하여 O₂ 양을 조절하여 hypoxia를 유발한 상태에서 실험군과 대조군의 protein 및 RNA를 추출하였다.

2) 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 isothiocyanate를 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 μl , 2M sodium acetate(pH4.0) 50 μl

를 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 15000 RPM에서 20분간 원심 분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000 μ l를 넣어 -70 $^{\circ}$ C에서 24시간 침전시켰다.

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

(2) cDNA의 제작

추출된 RNA 1 μ g은 MoMuLV 역전사효소(Gibco BRL)와 random hexamer primers를 이용하여 20 μ l의 cDNA로 전환되었다. 즉, 1 μ g의 추출된 RNA를 2 μ l의 transcriptase buffer, 1 μ l의 random hexamer (10 pM), 1 μ l의 MoMuLV-RT (10U/ μ l), 1 μ l의 dNTP (10 pM), 0.5 μ l의 RNase inhibitor를 넣고 총량이 20 μ l가 되도록 D.W.를 첨가하여 혼합한 뒤 23 $^{\circ}$ C에서 15분, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다.

(3) Primer의 제작

다음과 같이 primer를 제작하였다.

- Oligonucleotide primer sequences used for

quantitative RT-PCR analysis

(All sequences are listed 5' to 3')

(4) Quantitative PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10 × amplification buffer	10 μ l
Mixture of dNTP (10 pM)	5 μ l
Primer 1 (10 pM)	2 μ l
Primer 2 (10 pM)	2 μ l
Template cDNA	4 μ l
Tag DNA polymerase (2.5units)	0.5 μ l
H ₂ O	76.5 μ l

② 각각의 혼합물을 아래의 조건으로 34~40 cycle의 PCR 반응을 시행하였다.

a. First cycle

Denaturation	5 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	1 min at 72 $^{\circ}$ C

b. Subsequent cycles (32-38 cycles)

Denaturation	1 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	1 min at 72 $^{\circ}$ C

c. Last cycle

Denaturation	1 min at 94 $^{\circ}$ C
Annealing	1 min at 59 $^{\circ}$ C
Polymerization	10 min at 72 $^{\circ}$ C

Gene	Primer	Nucleotide sequences
GAPDH	2(Sense)	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3')
	3(Antisense)	5'-GACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3')
VEGF	1(Sense)	5'-CTTTATGTTTTGGCGTCTTCC-3')
	2(Antisense)	5'-GTCCGTCAGCGCGACTGGTCAG-3')
bFGF	1(Sense)	5'-CTGGGCATTTCAGAGTGGTTCGGCT-3')
	2(Antisense)	5'-ATTGACAGGCTACAGTCTACTAA-3')
TGF- β 1	S(Sense)	5'-CACTTGCAGGAGCGCACGATCATG-3')
	AS(Antisense)	5'-TTTCTGCTTCTCATGGCCACCCC-3')
IGF-II	1(Sense)	5'-AATTCAGTCGATTAGGCCATTAC-3')
	2(Antisense)	5'-GGACTGGCTTAGACTGTGCGATTCC-3')
TSP-1	3(Sense)	5'-TGTTGGCACCAACCGCATTCCAG-3')
	4(Antisense)	5'-CAGGTCTTGGAACTTGTCATCAGG-3')

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

3) 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 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 약 20 μ g의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였으며 anti-VEGF, anti-TGF- β 1, anti-bFGF, anti-IGF-II, anti-TSP-1 antibody (SantaCruz biotechnology)를 이용하여 Western blot을 수행하였다. Antibody binding은 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) 방법을 통해 검출하였으며 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 사용하였다.

4) ELISA를 이용한 혈관생성인자 단백질 발현의 분석

HepG2 세포의 혈관생성인자 단백질 발현이茵陳淸肝湯에 의하여 영향을 받는지의 여부를 분석하기 위하여 세포배양액으로 분비되는 VEGF, TGF- β , bFGF의 양을 human ELISA system (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 정량하였다. 즉 50 μ l의 배양액과 biotin-conjugated VEGF, TGF- β , bFGF를 각각 혼합한 후 약 2시간 실온에 방치하였으며 horseradish peroxidase-conjugated streptavidin과 TMB substrate를 혼합한 후 450nm에서의 OD값을 microplate reader를 이용하여 분석하였다.

III. 結 果

1. 茵陳淸肝湯이 HepG2의 혈관생성인자 mRNA 발현에 미치는 영향

茵陳淸肝湯이 인체간세포 HepG2의 혈관생성인자 유전자 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell을 배양하여(1 \times 10⁵ cells/well),茵陳淸肝湯을 처리 농도(1, 10, 50 μ g/ml for 48 hrs)와 처리 시간(12, 24, 48 hrs with 10 μ g/ml)을 달리하며 처리한 후, quantitative RT-PCR을 통해 target genes (VEGF, bFGF, TGF- β 1, IGF-II, TSP-1)에서 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 그 결과茵陳淸肝湯은 처리농도에 비례하여 VEGF, TGF- β 1 mRNA 발현을 뚜렷이 억제하였고 미약하지만 bFGF, IGF-II의 mRNA 발현에도 억제작용을 가지고 있음이 확인되었다(Table 1, Fig. 1.). 또茵陳淸肝湯은 처리시간에 비례하여 VEGF, TGF- β 1 mRNA 발현을 뚜렷이 억제하였고 bFGF, IGF-II의 mRNA 발현에도 억제작용을 가지고 있음이 확인되었다(Table 2, Fig. 2.).

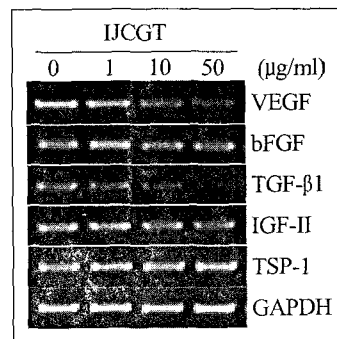


Fig. 1. Dose dependent effect of IJCGT on mRNA expression of angiogenic factors in HepG2 cell.

Table 1. Dose Dependent Effect of IJCGT on mRNA Expression of Angiogenic Factors in HepG2 Cell

	Control	IJCGT (μ g/ml; 48 h)		
		1	10	50
VEGF	1.00	0.84	0.72	0.64
bFGF	1.00	1.02	0.96	0.88
TGF- β 1	1.00	0.90	0.66	0.54
IGF-II	1.00	1.04	1.00	0.86
TSP-1	1.00	1.04	0.98	1.06

Table 2. Time Dependent Effect of IJCGT on mRNA Expression of Angiogenic Factors in HepG2 Cell

	Control	IJCGT (h; 10 μ g/ml)		
		12	24	48
VEGF	1.00	0.90	0.76	0.70
bFGF	1.00	1.00	0.94	0.90
TGF- β 1	1.00	1.15	0.62	0.56
IGF-II	1.00	0.96	0.90	0.84
TSP-1	1.00	1.02	1.02	1.04

Table 3. Dose Dependent Effect of IJCGT on Protein Synthesis of Angiogenic Factors in HepG2 Cell

	Control	IJCGT (μ g/ml; 48 h)		
		1	10	50
VEGF	1.00	0.90	0.76	0.68
bFGF	1.00	1.06	1.02	0.98
TGF- β 1	1.00	0.92	0.72	0.68
IGF-II	1.00	1.02	0.96	0.96
TSP-1	1.00	0.98	1.02	1.00

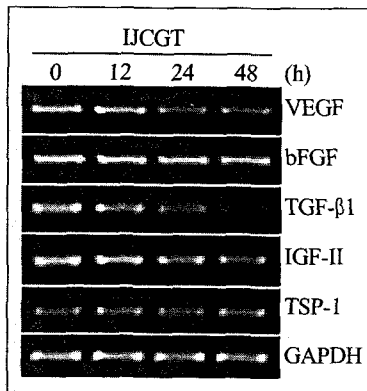


Fig. 2. Time dependent effect of IJCGT on mRNA expression of angiogenic factors in HepG2 cell.

2.茵陳清肝湯이 HepG2의 혈관생성인자 단백질 합성에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2의 혈관생성인자 단백질 합성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell을 배양하여(1 \times 10⁵cells/well),茵陳清肝湯을 48시간 동안 농도(1, 10, 50 μ g/ml)에 따라 처리한 후, Western blot assay를 통해 발현된 protein 량을 측정하였다. 그 결과茵陳清肝湯은 처리농도에 비례하여 VEGF,

TGF- β 1 단백질 발현을 억제하는 작용을 가지고 있음이 확인되었다(Table 3, Fig. 3.).

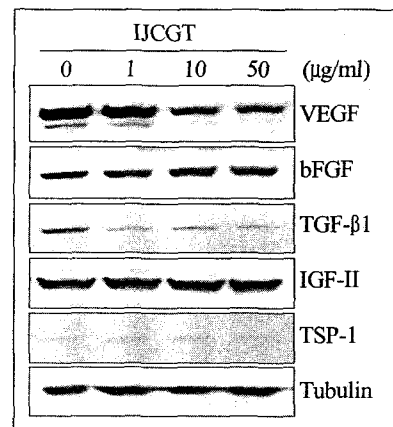


Fig. 3. Dose dependent effect of IJCGT on protein synthesis of angiogenic factors in HepG2 cell.

3.茵陳清肝湯이 혈관생성인자 단백질 합성에 미치는 영향 - 세포의 분비량 측정

茵陳清肝湯이 혈관생성인자 단백질 합성에 미치는 영향을 HepG2 cell의 세포의 분비량을 통해 측정하기

위하여 HepG2 cell을 배양하여(1×10^4 cells/well),茵陳清肝湯을 48시간 동안 농도(1, 10, 50, 100 μ g/ml)에 따라 처리한 후, ELISA assay를 통해 2회에 걸쳐 secreted protein 량을 측정하였다. 그 결과,茵陳清肝湯은 처리농도에 비례하여 VEGF, TGF- β 1 secretion을 억제하는 작용을 가지고 있음이 확인되었다(Table 4, 5.).

4. Hypoxic condition에 의해 유도되는 혈관생성인자 발현에 미치는 영향

Hypoxic condition에 의해 유도되는 혈관생성인자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, HepG2 cell을 배양하여(1×10^5 cells/well),茵陳清肝湯을 6시간 동안 10 μ g/ml의 농도로 전처리하고, hypoxic condition에서 시간(6, 12, 24 hrs)에 따라 처리한 후, quantitative RT-PCR을 통해 target genes(VEGF, bFGF, TGF- β 1, IGF-II, TSP-1)에서 발현된 mRNA 량을 측정하였다. 그 결과茵陳清肝湯은 hypoxia에 의해 촉진되는 VEGF mRNA, bFGF mRNA 발현증가를 뚜렷이 억제하였고, TGF- β 1, IGF-II 발현은 hypoxia에 의해 큰 영향을 받지 않았으나茵陳清肝湯은 TGF- β 1의 발현을 감소시켰고 IGF-II의 발현에 대해 미약하나마 억제작용을 나타냈으며, TSP-1

발현은 hypoxia에 의해 영향을 받지 않았으며茵陳清肝湯은 TSP-1 발현에 영향을 미치지 않았다(Table 6., Fig. 4.).

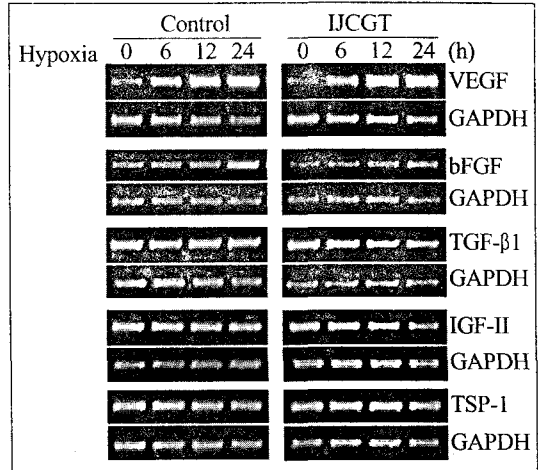


Fig. 4. Time dependent effect of IJCGT on mRNA expression of angiogenic factors in HepG2 cell in hypoxic condition.

5. Hypoxic condition에 의해 유도되는 혈관생성인자 단백질 분비에 미치는 영향

Hypoxic condition에 의해 유도되는 혈관생성인자

Table 4. Dose Dependent Effect of IJCGT on the Extracellular Secretion of Angiogenic Factors in HepG2 Cell (1st)

	Control	IJCGT (μ g/ml; 48 h)			
		1	10	50	100
Secreted VEGF	140	132	112	96	68
Secreted bFGF	164	168	154	150	138
Secreted TGF- β 1	280	276	226	192	154

Table 5. Dose Dependent Effect of IJCGT on the Extracellular Secretion of Angiogenic Factors in HepG2 Cell (2nd)

	Control	IJCGT (μ g/ml; 48 h)			
		1	10	50	100
Secreted VEGF	136	130	114	98	64
Secreted bFGF	152	150	148	138	134
Secreted TGF- β 1	242	236	214	186	146

Table 6. Time Dependent Effect of IJCGT on mRNA Expression of Angiogenic Factors in HepG2 Cell in Hypoxic Condition

		Hypoxia(h; 10 μ g/ml)			
		0	6	12	24
VEGF	Control	1.00	1.12	1.66	2.84
	IJCGT	0.96	0.98	1.10	1.62
bFGF	Control	1.00	1.04	1.42	1.82
	IJCGT	1.02	1.02	1.18	1.34
TGF- β 1	Control	1.00	1.04	1.02	1.12
	IJCGT	0.98	0.98	0.84	0.68
IGF- II	Control	1.00	0.96	0.98	1.06
	IJCGT	1.02	0.98	0.94	0.88
TSP-1	Control	1.00	1.00	1.04	1.02
	IJCGT	0.98	0.98	1.02	1.04

Table 7. Time Dependent Effect of IJCGT on the Extracellular Secretion of VEGF, bFGF in HepG2 Cell in Hypoxic Condition

		Hypoxia(h; 10 μ g/ml)			
		0	6	12	24
VEGF	Control	128	136	184	228
	IJCGT	118	114	128	142
bFGF	Control	154	160	180	188
	IJCGT	152	152	156	162

단백질 분비에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell을 배양하여(1×10^4 cells/well),茵蔯清肝湯을 6시간 동안 10 μ g/ml의 농도에서 전처리하고, hypoxic condition에서 시간(6, 12, 24hrs)에 따라 처리한 후, ELISA assay를 통해 발현된 secreted protein량을 측정하였다. 그 결과茵蔯清肝湯은 hypoxia에 의해 촉진되는 VEGF, bFGF secretion을 억제하는 작용을 가지고 있음이 확인되었다(Table 7).

IV. 考 察

종양, 특히 고형암의 성장과 전이는 맥관형성(angiogenesis)에 크게 좌우된다. 종양은 성장하기 위해서는 반드시 새로운 미세혈관의 증식을 촉진하여야 하는데, 새로운 혈관의 형성이 없이는 2~3mm 이상의 크기로 성장할 수 없다. 아울러 종양 내의 신생혈관은 종양세포의 체순환계로의 침투를 용이하게 하

여 원격전이를 일으키는 통로를 제공한다²¹. 이와 관련된 혈관형성 촉진물질로는 basic fibroblast growth factor(bFGF), vascular endothelial cell growth factor(VEGF), transforming growth factor- α (TGF- α), TGF- β , insulin-like growth factor II (IGF- II), interleukin-8(IL-8), angiogenin, angiotropin, epidermal growth factor(EGF), fibrin, nicotinamide, platelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등이 속한다. 또한 혈관형성 억제물질로는 thrombospondin-1(TSP-1), platelets factor-4, 16-kD fragment of prolactin, interferon α -2a, interleukin-12, angiostatin, endostatin 등이 속한다⁵.

한편, 간세포암은 B형 간염 바이러스의 유행지역인 우리나라에서 흔히 관찰되며 국내에서 남자에서 세 번째, 여자에서 여섯 번째로 호발하며 단기간 내에 사망에 이르는 치명적인 악성 종양이다¹. 간세포암은 과혈관성 종양으로 활발한 신생혈관의 생성을

보이는 특징이 있으며, 정상 간조직과 달리 혈류공급의 80%를 동맥을 통해 받고, 혈관형성의 정도가 종양의 진전과 밀접한 관련이 있다. 또한 조기에 문맥을 침범하여 간내 다발성 전이를 유발하며, 절제 후에도 미세 간내전이소의 성장으로 인해 조기에 간내재발하는 예후가 나쁜 종양이다²².

혈관생성인자들에 대한 기존 보고에서, VEGF는 간세포암, 결장암, 난소암 등 여러 종양에서 연구되어 종양의 미세혈관밀도와 밀접한 관련이 있으며, 종양의 성장, 혈관 침범, 전이와 재발에 영향을 미치는 인자로 보고된 바 있다^{23,24}. 또한 간세포암 환자에서 VEGF, bFGF, TGF- β 1이 발현된 경우 낮은 생존율을 보였으며, 특히 VEGF에서 종양의 크기 및 종양병기와 유의한 연관성이 있음이 밝혀졌는데, 간세포암에서 혈청 VEGF는 종양의 크기가 클수록 증가하여 종양의 진행정도를 반영하며, 미세혈관의 침범이 있는 경우 증가한다고 보고되었다³. 그리고 근치적 간절제를 시행한 3cm 이하 소간세포암에서 암조직과 주변 정상조직에서의 VEGF 발현의 비율이 0.8 이하인 경우, 즉 간세포암 조직의 VEGF 농도보다 주변 정상조직의 VEGF 농도가 더 높은 경우에 간세포암의 재발률이 유의하게 높은 것으로 나타나, VEGF의 발현 양상이 소간세포암 환자의 예후 및 재발여부를 가늠하는 중요한 척도가 될 수 있음이 보고되었다⁴.

bFGF는 유사분열 물질로 작용하며, 간세포암, 횡문근모세포종 및 세망내피종 세포 등이 이를 합성한다²⁵.

TGF- β 는 정상, 그리고 변형된 세포와 조직 내에서 혈관형성, 태아형성, 염증 그리고 면역억제 등 다양한 과정에서 중요한 조절 역할을 하고 있다²⁶.

IGF-II는 여러 가지 악성종양에서 높게 발현되어 oncogene으로부터 기인한 종양형성 과정에서 2차 signal 역할을 할 것이라 추측되고 있다²⁷.

종양세포에서 TSP-1의 혈관생성 억제인자로서의 역할은 다양하게 보고되어 왔는데, 특히 소화기계의 악성종양, 방광암, 편평상피세포암, 유방암 등에서 혈관생성 억제인자로 보고되었다²⁸.

한의학적으로 肝癌을 살펴보면, 脹滿, 積聚, 黃疸 등의 개념에 대응되며, 腹痛, 脹滿, 全身無力, 疲勞, 食欲不振, 惡心, 嘔吐, 黃疸, 發熱 등의 증상을 나타내고, 氣血瘀滯와 熱毒內熾 등의 證에 해당되어 清熱利濕, 活血行氣, 扶正祛邪 등의 방법으로 치료해 왔다²⁰.

본 實驗에 사용된 茵陳清肝湯은 茵陳四苓散에 地榆 覆盆子 蘿菈子 靑皮를 加味한 方劑이며 現在 臨床에서 清熱利濕을 目標로 急慢性肝病에 頻繁히 投與되고 있는 處方이다⁶.

茵陳清肝湯에 대한 기존의 연구로는, 안전성이 검증되었고⁸, 만성 B형 肝炎 환자에서 AST, ALT 등의 간기능 개선과 HBeAg의 음전효과⁶, 전격성 肝炎을 일으킨 마우스의 생존율을 높이는 효과⁹, 만성 肝炎이 肝硬變症으로 이행되는 것을 억제하는 효과 등이 보고되었다¹⁰.

최근에는 한약의 효능에 대한 분자생물학적 연구로 茵陳清肝湯과 茵陳四苓散 및 茵陳의 분획물로 세포사멸을 억제하며, 간세포를 보호하는 효과가 있음이 보고되었다¹¹⁻⁵. 또한 茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의해 유발되는 apoptosis로부터 간세포를 보호하고, 인터페론의 항바이러스 작용을 촉진할 수 있음이 보고되었다^{16,17}.

茵陳清肝湯의 항암효과에 관한 연구로는, 茵陳清肝湯이 간암세포주 HepG2.2.15의 증식을 억제하는 효과, HepG2.2.15의 DNA 합성을 억제하는 효과, HBV-X gene의 MAP kinase의 인산화를 억제하는 효과가 있어, 이를 통해 HBV로 인한 간암발생을 억제하는 효과가 있음이 보고되었다¹⁸.

본 연구에서는 茵陳清肝湯이 간암의 혈관생성인자 발현에 미치는 작용을 분자생물학적인 관점에서 파악하고자, 저자는 茵陳清肝湯을 HepG2 cell에 전처리하고, 혈관생성인자 VEGF, bFGF, TGF- β 1, IGF-II, TSP-1의 mRNA 및 단백질 발현을 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었다.

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 혈관생성인자 유전자 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell에 茵陳清肝湯을 처리 농도(1, 10, 50 μ g/ml)

와 처리 시간(12, 24, 48 hrs)을 달리하며 처리한 후, quantitative RT-PCR을 통해 target genes(VEGF, bFGF, TGF- β 1, IGF-II, TSP-1)에서 발현된 mRNA량을 측정하였다. 그 결과茵陳清肝湯은 처리농도(1, 10, 50 μ g/ml)에 비례하여 VEGF, TGF- β 1 mRNA 발현을 뚜렷이 억제하였고, bFGF, IGF-II의 mRNA 발현에도 약간의 억제작용을 가지고 있음이 확인되었다. 또한茵陳清肝湯은 처리시간(12, 24, 48hrs)에 비례하여 VEGF, TGF- β 1 mRNA 발현을 뚜렷이 억제하였고, bFGF, IGF-II의 mRNA 발현에도 억제작용을 가지고 있었으며, TSP-1의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되었다.

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 혈관생성인자 단백질 합성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell에茵陳清肝湯을 48시간 동안 농도(1, 10, 50 μ g/ml)에 따라 처리한 후, Western blot assay를 통해 발현된 protein량을 측정한 결과,茵陳清肝湯은 처리농도(1, 10, 50 μ g/ml)에 비례하여 VEGF, TGF- β 1 단백질 발현을 억제하는 작용을 가지고 있음이 확인되었다.

茵陳清肝湯이 혈관생성인자 단백질의 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 HepG2 cell에茵陳清肝湯을 48시간 동안 농도(1, 10, 50, 100 μ g/ml)에 따라 처리한 후, ELISA assay를 통해 2회에 걸쳐 secreted protein량을 측정할 결과,茵陳清肝湯은 처리농도(1, 10, 50, 100 μ g/ml)에 비례하여 VEGF, TGF- β 1 단백질의 세포외 방출을 억제하는 작용을 가지고 있음이 확인되었다.

종양은 성장하기 위해 산소를 필요로 하고, 이를 위해서는 혈관생성이 필수적이다^{29,30}. Hypoxia 상태는 종양에서 혈관생성이 일어나는데 필요한 중요한 자극 중 하나이다³¹. 이러한 혈관생성에 관여하는 여러 혈관생성인자들 역시 hypoxia 상태에서 발현이 촉진되는 것으로 알려져 있다³².

이에 본 연구에서는 hypoxic condition에 의해 유도되는 혈관생성인자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell에茵陳清肝湯을 6시간 동안 10 μ g/ml의 농도에서 전처리하고, hypoxic condition에서 시간(6, 12, 24hrs)에 따라 처리한 후, quantitative

RT-PCR을 통해 target genes(VEGF, bFGF, TGF- β 1, IGF-II, TSP-1)에서 발현된 mRNA량을 측정하였다. 그 결과茵陳清肝湯은 hypoxia에 의해 촉진되는 VEGF mRNA, bFGF mRNA 발현증가를 뚜렷이 억제하였다. TGF- β 1 발현은 hypoxia에 의해 큰 영향을 받지 않으나茵陳清肝湯은 TGF- β 1의 발현을 감소시켰다. IGF-II 발현은 hypoxia에 의해 큰 영향을 받지 않으며茵陳清肝湯은 IGF-II의 발현에 대해 미약하나마 억제작용을 나타냈다. TSP-1 발현은 hypoxia에 의해 영향을 받지 않으며茵陳清肝湯은 TSP-1 발현에 영향을 미치지 않았다.

Hypoxic condition에 의해 유도되는 혈관생성인자 단백질 분비에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell에茵陳清肝湯을 6시간 동안 10 μ g/ml의 농도로 전처리하고, hypoxic condition에서 시간(6, 12, 24 hrs)에 따라 처리한 후, ELISA assay를 통해 발현된 secreted protein량을 측정하였다. 그 결과茵陳清肝湯은 hypoxia에 의해 촉진되는 VEGF secreted form의 발현을 억제하는 작용을 가지고 있음이 확인되었다. 또한茵陳清肝湯은 hypoxia에 의해 촉진되는 bFGF secreted form의 발현을 억제하는 작용을 가지고 있음이 확인되었다.

이상에서茵陳清肝湯은 인체 간암세포의 혈관생성 촉진인자의 발현을 억제하는 작용이 있음을 확인하였으며, 특히 VEGF, bFGF, TGF- β 1에서 현저하였다. 이와 관련하여 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

茵陳清肝湯이 간암의 혈관생성인자 발현에 미치는 작용을 분자생물학적인 관점에서 파악하기 위하여,茵陳清肝湯을 전처리한 HepG2 cell에서 혈관생성인자 VEGF, bFGF, TGF- β , IGF-II, TSP-1의 mRNA 및 단백질 발현을 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1.茵陳清肝湯은 처리농도, 처리시간에 비례하여

- VEGF, TGF- β 1 mRNA 발현을 뚜렷이 억제하였다.
2. 茵陳清肝湯은 처리농도에 비례하여 세포 내의 VEGF, TGF- β 1 단백질 발현을 억제하였다.
 3. 茵陳清肝湯은 처리농도에 비례하여 세포 외로의 VEGF, TGF- β 1 단백질 방출을 억제하였다.
 4. 茵陳清肝湯은 hypoxia에 의해 촉진되는 VEGF, bFGF mRNA 발현증가를 뚜렷이 억제하였다.
 5. 茵陳清肝湯은 hypoxia에 의해 촉진되는 세포 외로의 VEGF, bFGF 단백질 방출을 억제하였다.

이상에서 茵陳清肝湯은 VEGF, bFGF, TGF- β 1 등의 혈관생성 촉진인자의 유전자 및 단백질 합성의 억제를 통해서 항암효과를 발휘할 수 있을 것으로 판단된다. 이와 관련하여 향후 茵陳清肝湯과 혈관생성인자와 관련된 항암효과에 대하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 보건복지부. 암발생통계 1999-2001. 경기도 과천: 보건복지부; 2006, p.38.
2. 통계청. 2004년 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2003.
3. 홍성우, 황동희, 백인욱, 이혁상. 간세포암 환자에서 혈청 혈관내피세포성장인자와 종양의 미세혈관 침범. 대한외과학회지. 2003;64(3):224-8.
4. 이지현, 이광웅, 김성주, 최성호, 허진석, 김용일 등. 소간세포암에서 혈관내피세포성장인자의 발현과 재발과의 상관관계. 대한외과학회지. 2005; 68(1):50-5.
5. 김우호. 악성종양에서의 혈관형성. 대한소화기학회 연수강좌. 1998.
6. 우홍정. 만성B형간염에 대한 茵陳清肝湯의 효과. 제2회한중학술대회참가논문집. 1995:18-53.
7. 장중경. 급류요약. 서울: 행림서원; 1984, p.392-4.
8. 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯의 안전성에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1997;20:57-89.
9. 김진주. 茵陳清肝湯이 MHV-2로 유발된 마우스의 손상간에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 1996.
10. 강경태, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯가미방이 실험적 흰쥐의 간경변증에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1997;20:133-50.
11. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯가미방이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19:45-164.
12. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯가미방이 간세포활성세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19:337-72.
13. 고흥, 이장훈, 우홍정. 인진사평산 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-Mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21:174-85.
14. 이종훈, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 HepG2 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 한방내과학회지. 2003;21(3):363-8.
15. 이지현, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 인체간세포의 TGF- β 1 induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;20:53-61.
16. 강우성, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α 신호전달계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):28-45.
17. 이종훈, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 인터페론 신호전달계에 미치는 영향. 대한한방내과학회. 2005;26(1):74-92.
18. 우홍정, 이장훈, 김영철. 茵陳清肝湯의 항암효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 1999;23(3):94-104.
19. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998, p.65, 142, 274, 286-7, 310, 501, 522, 561, 590, 610.
20. 전국한의과대학 간계내과학교실. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001, p.351-2, 365-7.
21. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Bio Chem. 1992;267:10931-4.
22. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fisher JE, Galloway AC. Principles of Surgery. 7th edition. Singapore: McGraw-Hill; 1999, p. 1409.

23. Saito H, Tsujitani S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma. *Surgery*. 1999;125:195-201.
24. Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. p53, vessel count and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer*. 1998;79:34-8.
25. Jin-No K, Tanimizu M, Hyodo I, Kurimoto F, Yamashita T. Plasma level of basic fibroblast growth factor increase with progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol*. 1997;32:119-21.
26. Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, Hsieh MY, Lin ZY, et al. Urinary transforming growth factor- β 1 in relation to serum α -fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol*. 1997; 32:254-60.
27. Christofori G, Naik P, Hanahan D. A second signal supplied by insulin-like growth factor 2 in oncogene-induced tumorigenesis. *Nature(Lond)*. 1994;369:414-8.
28. Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, Nomura T, Ohkubo S, Yamamoto Y, et al. Inhibition of Infiltration and Angiogenesis by Thrombospondin-1 in Papillary Thyroid Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002;8:1125-31.
29. Knowles J, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1 and angiogenesis in cancer. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005;3(4):309-14.
30. Brennan PA, Mackenzie N, Quintero M. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(7):385-9.
31. Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003;12(2):12.
32. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadowe, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression on solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94: 8104.