

生肝健脾湯이 HepG2 cell의 증식, 세포사멸 및 활성조절 신호전달계에 미치는 영향

김재용, 김영철, 이상훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of Saengkankunbi-tang on Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling Pathways of HepG2 Cells

Jae-yong 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 done to evaluate the effects of Saengkankunbi-tang on cell-viability, proliferation, cell-cycle, apoptosis and DNA replication on HepG2 cell and to find out by which molecular-biological mechanism by which Saengkankunbi-tang operates.

Methods : The MTT assay, cell counting assay, [3H]-thymidine incorporation assay, flow cytometric analysis, trypan blue exclusion assay, western blot analysis, quantitative RT-PCR were taken.

Results : Saengkankunbi-tang had no effect on proliferation, cell-cycle and DNA replications of HepG2 cells, while it improved cell viability and reduced apoptosis, and it activated Akt and NFκB. But, it did not produce an effect on cell viability and apoptosis when PI3K/Akt pathway was blocked by LY294002 nor when NFκB activation was blocked by DN-IκB.

Conclusion : These results suggests that Saengkankunbi-tang improves cell viability and reduces apoptosis of HepG2 cells, by activating NFκB through PI3K/Akt pathway.

Key Words: Saengkankunbi-tang, PI3K/Akt pathway, NFκB, apoptosis, HepG2 cell

1. 緒 論

우리나라는 만성 간질환에 의한 사망률이 매우 높은 것으로 보고되고 있다¹. 최근 십여년간 B형 간염 예방정책이 시행되면서 B형 간염 바이러스 보유율이 점차 감소하고는 있으나 여전히 우리나라 성인 인구의 약 5%에 이르고 있으며² 과거 비교적 이환율이 낮았던 C형 간염 및 알코올성 간질환 환자의 발생

은 점차 증가하고 있어^{3,4} 이러한 각종 간질환은 개인 뿐 아니라 사회적 차원에서도 지속적 관심을 가져야 할 문제로 인식되고 있다.

生肝健脾湯은 茵陳五苓散에 加減胃苓湯 재료를 가미한 처방으로,脾胃의 濕熱을 제거시키고 利尿·健脾·利膽을 도모하여 간의 생리기능을 平衡케하는 방제이다. 임상적으로는 바이러스성 급·만성간염, 간경변증 등 각종 간질환에 광범위하게 사용되고 있는 방제이다^{5,6}.

生肝健脾湯에 관한 실험적 연구로는 金⁵이 간장의 대사와 재생능력에 미치는 영향을 보고하였으며, 임상적 연구로는 金⁶이 만성간염 3136례에 대한 임상

· 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)

분석과 치료효과를 보고한 바 있다.

최근 분자생물학의 발달에 따라 각종 간질환에 있어서 관련 유전자 및 단백질의 작용기전을 규명함으로써 새로운 치료법을 모색하려는 시도가 활발히 이루어지고 있는데, 한의학에서도 역시 이러한 연구가 다양하게 이루어지고 있다⁷⁻¹².

본 연구에서는 生肝健脾湯의 간기능 보호 및 회복작용을 분자생물학적 관점에서 파악함으로써 生肝健脾湯의 임상효과와 분자적 작용기전과의 상관성을 알아보고자 하였다.

生肝健脾湯이 인체 간세포 HepG2의 증식에 미치는 영향을 DNA 합성 및 세포분열주기를 통해 관찰하였으며, 세포사멸을 유도하는 독성 물질에 대한 간세포의 반응에 미치는 영향을 MTT assay 등을 통하여 분석하였다. 또한 간독성물질 및 inflammatory cytokine 등에 의하여 유발되는 간세포 사멸 또는 활성저하에 대한 生肝健脾湯의 회복기능을 파악하기 위하여 간세포 활성조절의 대표적인 신호전달체인 NF- κ B 및 PI3k/Akt 신호전달계에 미치는 영향을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전외한약(생약) 규격집¹³에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 生肝健脾湯 1첩 분량(97.5g)을 3차 증류수 500ml에 혼합하여 90ml가 될 때까지 가열, 농축시키고 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 건조추출물 21.3g(수율; 21.84%)을 얻었다. 얻어진 추출물을 DMEM 배지 110ml에 더하여 37℃에서 3시간 동안 녹였다. 원심분리하여

Prescription of Saengkankunbi-tang

韓藥名	生藥名	用量(g)
茵 陳	Artimisiae capillaris Herba	15.00
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	15.00
白 朮	Atractylodis Rhizonma alba	7.50
山查肉	Crataegi Fructus	7.50
麥 芽	Hordei Fructus	7.50
陳 皮	Aurantii nobilis Pericarpium	3.75
白茯苓	Hoelen	3.75
豬 苓	Poylporus	3.75
厚 朴	Machili Cortex	3.75
藿 香	Agastaches Herba	3.00
蘿 蔔子	Raphani Semen	3.00
枳 實	Ponciri Fructus	3.00
三 棱	Scripi Tuber	3.00
蓬 朮	Zedoariae Rhizoma	3.00
青 皮	Aurantii Pericarpium	3.00
唐木香	Saussureae Radix	3.00
砂 仁	Amomi Semen	3.00
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3.00
生 薑	Zingiberis Rhizoma	3.00
Total		97.50

남아있는 시료를 제거한 상층액을 0.45 μ m 필터(Millipore, USA)로 여과하여 멸균하고 4℃에 저장하였다.

2. 방법

1) 세포배양

인체 간암세포주 HepG2 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하여 DMEM 90%와 fetal bovine serum 10% 혼합 배지를 이용하여 5%의 CO₂ 상태가 유지되는 37℃ incubator에서 배양하였다.

2) HepG2 cell에 대한 검액의 처리

生肝健脾湯이 HepG2 cell에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1 \times 10⁵/well의 밀도로 배양한 후 生肝健脾湯을 0.1, 1, 10, 25, 50, 100 μ g/ml의 농도로 12, 24, 48, 72 시간동안 처리하였다. 유전자 발현의 변화를 분석하기 위하여 대조군 및 약물이 처리된 세포를 0.1% trypsin을 이용하여 회수하여

total RNA를 추출하였으며 정량적 RT-PCR 분석을 이용하여 각 유전자의 mRNA 발현양상을 비교분석하였다.

3) MTT 반응실험

(1) MTT 용액제작 및 처리

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 5mg/ml을 PBS(phosphate buffered saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 후 0.22 μ m의 filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 그 후 1 \times 10⁵개의 세포를 포함하고 있는 100 μ l의 cell suspension에 10 μ l의 MTT stock solution을 첨가하였다.

(2) 효소반응과 면역형광측정

MTT stock solution에 cell suspension을 첨가한 상태로 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 보존한 후 100 μ l의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 각각의 well에 잘 혼합하여 blue formazan crystals을 완전히 용해시켰다. 효소의 용해가 끝난 뒤 570nm에서 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) reader로 OD (optical density)를 측정하였다.

4) Cell counting analysis

生肝健脾湯이 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1 \times 10⁵/well의 밀도로 seeding한 후 生肝健脾湯을 0.1, 1, 10, 25, 50 μ g/ml의 농도로 24, 48, 72시간 동안 처리하였다. 生肝健脾湯을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조군 세포는 trypsinization을 통해 회수하였으며 cell counter(Coulter)를 이용하여 세포수를 측정하였다.

5) [3H]-thymidine Incorporation assay를 이용한 세포증식분석

HepG2 cell의 DNA 합성에 미치는 生肝健脾湯의 영향을 조사하기 위하여 [3H]-thymidine incorporation assay를 시행하였다. HepG2 cell을 1 \times 10⁵ cells/well의 밀도로 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 새로운 배지로 교환함과 동시에 生肝健脾湯을 0.1, 1, 10, 25, 50 μ g/ml의 농도로 처리하였다. 生肝健脾湯 처리 20 시간 후에 1.0 μ Ci/ml의 [3H]-thymidine(Amersham, Arlington Heights, IL)을 4시간 동안 pulse-

labeling 하였고 DNA내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양(count per minute: CPM)은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

6) Flow cytometric analysis

Cell pellet(5 \times 10⁵)를 0.2ml PBS에 현탁시킨 후 2 ml의 ice-cold 75% ethanol/25% PBS를 첨가하여 고정시켰다. PBS에 강력하게 재현탁시킨 후 100 μ g/ml RNase와 40 μ g/ml PI(propidium iodide)가 포함된 PBS에서 37 $^{\circ}$ C로 30분간 배양한 후 세포를 회수하여 FACScan (FACS Caliber cellquest program [Becton Dickinson])을 이용하여 cell cycle을 측정하였다.

7) Trypan blue exclusion assay

HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 生肝健脾湯의 영향을 조사하기 위하여 trypan blue exclusion assay를 시행하였다. HepG2 cell을 2 \times 10⁵ cells/well의 농도로 6-well plate에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. Apoptosis를 유도하기 위하여 etoposide(10 μ M) 또는 H₂O₂(50 μ M)를 투여하였다. 生肝健脾湯의 처리는 etoposide 또는 H₂O₂ 투여 12시간 전에 시행하였으며 apoptosis의 변화유무를 대조군과 비교분석하였다.

8) Western blot analysis

Lysis buffer[20mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5mM sodium phosphate, 1mM beta-glycerolphosphate, 1mM NaVO₄, 1mM PMSF]를 이용하여 회수된 세포를 용해시킨 후 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 약 20 μ g의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였으며 anti-Akt, anti-Erk1/2, anti-JNK antibody(SantaCruz biotechnology)를 이용하여 Western blot을 수행하였다. Antibody binding은 enhanced chemiluminescence(ECL, Amersham Pharmacia Biotech) 방법을 통해 검출하였으며 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 사용하였다.

9) NF κ B 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 원심분리하였으며 100 μ l의 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 pellet을 얼음위에 약 10분간 방치시킨 후 13,000×g로 2분간 원심분리하여 supernatants (cytosolic extracts)를 취하였으며 즉시 dry ice/ethanol bath에 보관하였다. Pelleted nuclei는 60 μ l의 high salt buffer (20mM Hepes, pH 7.9, 420mM NaCl, 10mM KCl, 0.1mM NaVO₄, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 20% glycerol, supplemented with CompleteTM)로 resuspension 한 후 protein 추출을 위해 약 30분간 shaking 하였다. 이를 13,000×g로 10분간 원심분리한 후 supernatants를 취하였다. 분리된 핵질과 세포질의 순도는 U1 SnRNP 70과 beta-tubulin에 대한 immunoblotting을 통하여 각각 검증하였다.

10) 정량적 RT-PCR 분석

(1) Total RNA의 추출

Total RNA는 배양된 세포로부터 single-step method에 의해 추출하였다. RNA 추출을 위한 solution D는 GSS solution(250g의 guanidine isothiocyanate, 17.6ml의 0.75M sodium citrate, 26.4ml의 10% sarkosyl 그리고 293ml의 3차 증류수)에 0.1M 농도의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 만들었다. 배양 후 회수된 세포들에 500 μ l solution D와 2M의 50 μ l sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 vortexing 하였다. 500 μ l water-saturated phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1)을 혼합하여 20초간 vortexing한 후 15분간 얼음에서 방치하였고 20분간 15000×g로 원심분리한 후 상층액에 1000 μ l cold isopropanol을 혼합하여 -70℃에서 24시간동안 저장한 후 침전시켰다. RNA를 20분간 15000×g로 원심분리한 후 RNA pellets을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척하였다. RNA는 30 μ l의 RNase-free water에 용해시켰다. 추출된 RNA의 농도는 흡광도 260nm과 280nm에서 spect-

rophotometric measurement(Schimidzu Scientific Instruments, Inc., Concord, CA, USA)로 측정하며, optical density(260/280)의 비율 1.0을 40 μ g/ml RNA로 정하여 농도를 결정하였다.

(2) cDNA의 합성

추출된 1 μ g의 RNA는 MoMuLV(Gibco)과 random hexamer primers를 사용하여 20 μ l cDNA로 역전사시켰다. 1 μ g의 추출된 RNA를 2 μ l의 reverse transcriptase buffer, 1 μ l의 random hexamer(10pM), 1 μ l의 MoMuLV-RT (10U/ μ l), 1 μ l의 dNTP(10pM), 그리고 0.5 μ l의 RNase inhibitor와 혼합하였다. 이 혼합물은 23℃에서 15분간, 42℃에서 1시간 그리고 95℃에서 5분간 반응시켰다. 각각의 RNA로부터 얻어진 2개의 분리된 cDNA는 1:4 또는 1:8로 sterile H₂O로 희석하여 PCR 반응에 이용하였다.

(3) RT-PCR 시행

유전자 발현에 대한 정량적 분석을 위하여 cycle numbers(21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42cycles)를 증가시키면서 연속적으로 희석된 cDNAs (1:0, 1:2, 1:4, 1:8)에 대한 PCR을 시행하였다. 각각의 cycle은 95℃로 1분간의 denaturation, 58-62℃로 45초간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간의 polymerization으로 구성하였다. 50 μ l의 PCR 반응에서 12.5-25ng의 cDNA는 26-34cycle을 시행하는 동안 housekeeping standard GAPDH을 포함한 모든 유전자들의 증폭이 대수적으로 증가함이 확인되었다. RT-PCR 산생물은 1시간동안 110 volts로 2% agarose gels (FMC, Rockland, ME)을 이용하여 분리하였다. Agarose gel은 30분간 ethidium bromide (0.5 μ g/ml of 1 X TBE)로 염색한 후 15분간 1 X TBE로 탈색하였다. PCR 산생물은 자외선을 이용하여 가시화한 후 사진촬영하였다. 사진영상의 음영이 깨끗해지도록 증류수에 적시고 나서 건조시켰다. Unspliced RNA 또는 genomic DNA의 PCR 산생물과 spliced mRNA의 PCR 산생물의 감별을 위하여 3'과 5' primer는 적어도 하나의 intron에 의해 분리되어 각각 다른 exons에 놓여지도록 제작한다. 각각의 유전자 증폭에 대한 RT-PCR의 특이성은 biotinylated internal oligonu-

cleotides를 이용한 Southern probing analysis로 확인하였다.

(4) RT-PCR 산생물의 densitometric analysis

유전자 발현에 대한 정량화는 ethidium bromide-stained gels을 laser densitometry로 scanning하여 얻었다. Signal intensity의 측정은 IBM 호환 컴퓨터에서 Molecular Analyst Program (version 2.0)을 이용하

여 laser densitometer (Bio-Rad)로 실행하였다. RT-PCR 산생물 사진영상의 음영조절부는 지속적으로 scanning하고, 배경의 intensity를 감산한 후 house-keeping gene인 GAPDH의 intensity에 대한 각각의 유전자 발현 intensity의 비율을 계산함으로써 유전자의 발현을 정량화하였다. 각각의 준비된 cDNA는 최소 2회의 정량적 RT-PCR을 반복 시행하였다.

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

Gene	Primer	Sequences	Orientation
GAPDH	2	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	sense
	3	GACCATGAGAAGTATGACAACAGC	antisense
c-Myc	1	GATTCTCTGCTCTCCTCGACGGAG	sense
	2	GCGCTGCGTAGTTGTGCTGATGTG	antisense
Cyclin D1	1	TCTAAGATGAAGGAGACCATC	sense
	2	GCGGTAGTAGGACAGGAAGTTGTTG	antisense
CDK4	1	GGTAAGCTGCATCGATCGGCTAC	sense
	2	AAATCCAGTCACCTAGGTAGCTC	antisense
p53	5789	TCTGTCCCTTCCCAGAAAACC	sense
	6930	TTGGGCAGTGCTCGCTTAGTGCTCC	antisense
p21/Waf1	SC05	AGCTGGGCGCGGATTCGCCGAG	sense
	SC04	AGGCTTCCTGTGAGCGGGCCTTTG	antisense
p27/Kip1	1	CCATAGCCTAGTCAACAGATCAC	sense
	2	AGGCATAGGCGCTTTAACGAGAGT	antisense
RB1	1	AATCCCGTAGATCGAGAGTCCGG	sense
	2	CCTAACAGTTGATCGAGGTCCCTA	antisense
p16/INK4a	1	AACATACCATTTGGGACATGAGTC	sense
	2	GACTTGACCGTGC GG TAGTAGTT	antisense
PIK3CA	1	CCAGGACTTGACTTAACTGGATT	sense
	2	TAGCCCCATGGATCCGAATCCCTA	antisense
PTEN	1	ACATCTCTACTATACATCTTGAT	sense
	2	ACATCTCTCCTATTTATAGTCGTT	antisense
PDK-1	1	CCATCTTTTGATTTCGATGCTGT	sense
	2	TTGTGAGGCTGGCATGCGATCTTGA	antisense
Akt-1	1	CACTTGACCCAGTTAAACTGGGAT	sense
	2	TTAACCGATTGACGAGCTTCTTTG	antisense
NFκB(p65)	S	AAGTCGATCGAGATCGATGGTGTGCC	sense
	AS	AGAGTCGGTGCTGAATGACGCCGCCA	antisense
IκB	A	CCAGGGCAATCTTACAGATCTCGATA	sense
	AS	CCACACATCGCGCTGGGTAGCTAGAG	antisense

III. 結果

1. MTT assay를 이용한 cell viability 분석

生肝健脾湯이 간세포의 증식 및 사멸에 미치는 영향에 대한 분석에 앞서 약물의 과잉 투여에 의하여 유발될 수 있는 세포독성과 실험을 위한 적정 투여 농도범위의 결정을 위하여 MTT assay를 시행하였다. 3차 증류수를 이용하여 生肝健脾湯을 0.1, 1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석한 후 1×10^5 개의 배양 HepG2 cell에 12, 24, 48시간 처리하였고 ELISA

를 이용한 MTT assay를 시행하여 세포활성의 변화를 분석하였다. 生肝健脾湯을 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 경우 세포활성이 증가하는 양상을 보였고, 25~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 세포활성의 변화가 관찰되지 않은 반면, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리할 경우 세포활성의 감소가 관찰되었다. 본 실험결과를 토대로 이후 약물의 세포증식에 미치는 영향에 대한 실험에 적용될 약물의 투여농도는 약물의 독성효과를 배제할 수 있는 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위로 제한하였다.

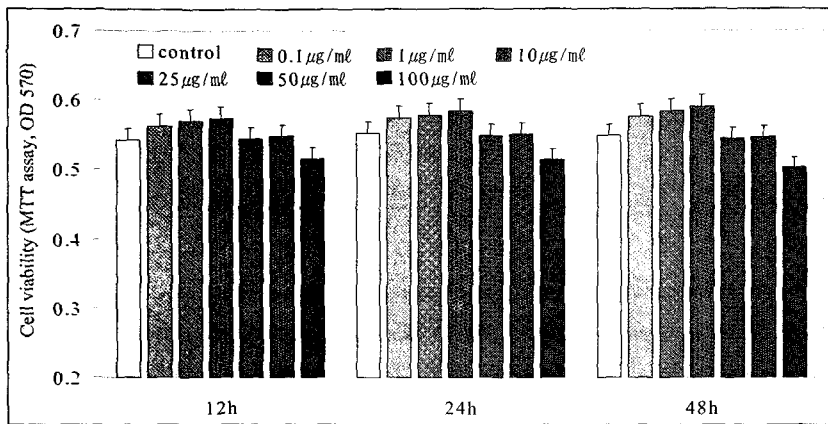


Fig. 1. Effect of Saengjankunbi-tang(SKKBT) on HepG2 cell viability (MTT assay)
; Each value represents the exponent obtained from optic density and cell concentration

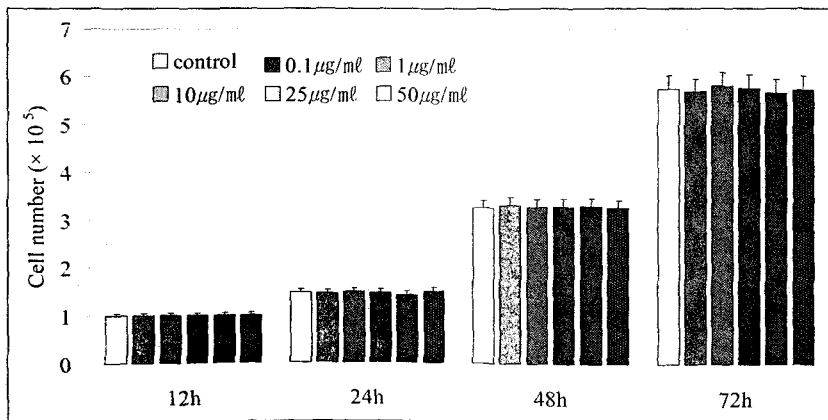


Fig. 2. SKKBT had no effect on HepG2 cell proliferation (cell counting assay)
; Each value represents cell number($\times 10^5$ cells)

2. HepG2 cell의 증식에 미치는 영향

生肝健脾湯이 HepG2 cell의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 生肝健脾湯의 처리시간과 HepG2 cell의 증식과의 관련성 유무를 cell counting assay을 이용하여 분석하였다. 위 MTT assay의 결과를 기초로 하여 약제의 처리농도는 세포독성을 야기하지 않는 농도인 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위로 정하였다. 生肝健脾湯 처리후 24, 48, 72시간 후에 세포를 회수하여 세포의 수를 대조군과 비교하였다. 그 결과, HepG2 cell의 증식은 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 모두에서 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.

3. HepG2 cell의 DNA 합성에 미치는 영향

生肝健脾湯이 HepG2 cell의 DNA 합성에 영향을 미치는지 파악하기 위하여 [3H]-thymidine incorporation assay를 수행하였다. 위 MTT assay의 결과를 기초로 하여 약제의 처리농도는 세포독성을 야기하지 않는 농도인 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위로 정하였다. 약제는 24시간 동안 처리하였으며 세포회수 4시간 전에 [3H]-thymidine을 투여하였고 DNA내에 incorporation된 [3H]-thymidine의 양을 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. 그 결과, HepG2 cell의 DNA 합성능은 生肝健脾湯에 의하여 영향을 받지 않음이 관찰되었다.

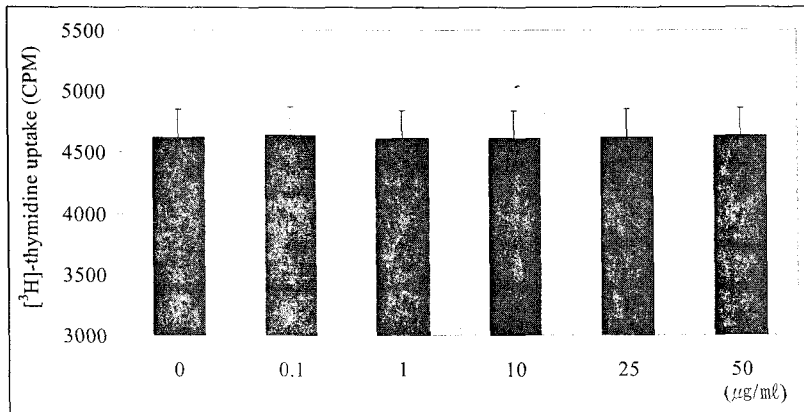


Fig. 3. SKKBT had no effect on HepG2 cell DNA synthesis ([3H]-thymidine incorporation assay)
; CPM: count per minute

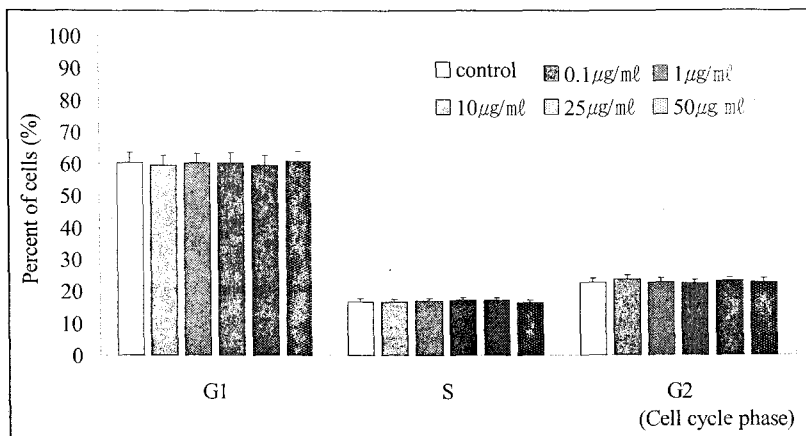


Fig. 4. SKKBT had no effect on HepG2 cell cycle phase (flow cytometric analysis)

4. Flow cytometric analysis를 이용한 세포분열주기에 대한 분석

生肝健脾湯이 HepG2 cell의 세포분열주기 중 특정 단계에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 세포분열주기에 대한 분석을 수행하였다. 0.1, 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 HepG2 cell을 48시간 처리한 후에 10,000개의 세포에 대한 DNA content를 분석하였고 이를 약물로 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 生肝健脾湯 처리군에서 특이할 만한 세포분열주기의 변화가 관찰되지 않았다.

5. HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향

生肝健脾湯이 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 측정하기 위해 HepG2 cell(2×10^5 cells/well)에 生肝健脾湯을 0, 0.1, 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 투여하고, 12시간이 지난 후 apoptosis를 유도하기 위해 각각 etoposide(10 μM) 또는 H₂O₂(50 μM)을 투여하였으며 대조군에는 etoposide 및 H₂O₂을 투여하지 않았다. 24시간 이후 tryphan blue exclusion assay를 통해 apoptosis 정도를 측정하였다. 그 결과, 生肝健脾湯은 HepG2 cell의 자연적인 apoptosis는 물론 DNA 손상유발 chemical 및 reactive oxygen radical에 의한 apoptosis를 처리농도에 비례하여 억제시킴이 관찰되었다.

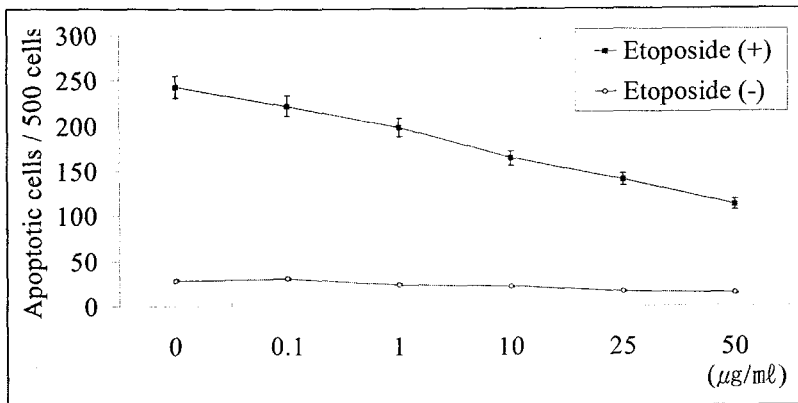


Fig. 5. SKKBT Decreased Etoposide Induced Apoptosis of HepG2 Cell (tryphan blue exclusion assay)

; Each value represents apoptotic cells/total cells counted (500).

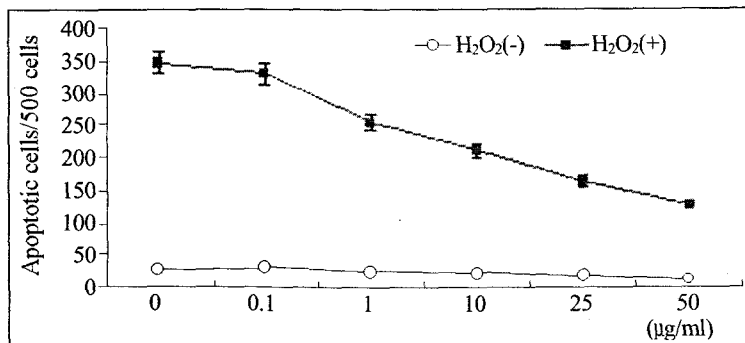


Fig. 6. SKKBT decreased H₂O₂ induced apoptosis of HepG2 cell (tryphan blue exclusion assay)

; Each value represents apoptotic cells/total cells counted (500).

6. 生肝健脾湯이 Akt, Erk, JNK 신호전달계에 미치는 영향에 대한 분석-I

生肝健脾湯이 apoptosis를 억제시키는 분자 생물학적 기전을 확인하기 위해 Akt, Erk, JNK 신호전달계에 미치는 영향을 분석하였다. HepG2 cell(1×10⁵ cells/well)에 生肝健脾湯을 0, 1, 10, 50µg/ml 농도로 투여하고, 24시간이 지난 후 Akt, Erk, JNK의 인산화 정도를 western blot analysis를 통해 측정하였다. 그 결과, 生肝健脾湯은 Akt의 인산화를 증가시키는 반면, Erk 및 JNK의 인산화에는 영향을 미치지 않음이 관찰되었다.

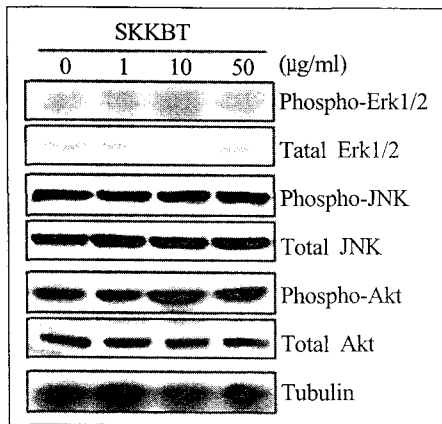


Fig. 7. Dose-dependent increase in phosphorylation level of Akt (western blot analysis)

Table 1. Phosphorylation Level of Akt, Erk, JNK

	SKKBT (µg/ml, 24h)			
	0	1	10	50
Akt	1.00	1.16	1.64	2.24
Erk	1.00	1.04	0.98	0.96
JNK	1.00	0.96	0.98	1.02

; Each value represents relative ratio of phosphorylated/total when that of the control is set to 1.0.

Table 2. Phosphorylation Level of Akt

	SKKBT (h, 10µg/ml)			
	0	6	12	24
Akt	1.00	1.14	1.28	1.80

; Each value represents relative ratio of phospho-Akt/total Akt when that of the control is set to 1.0.

7. 生肝健脾湯이 Akt 신호전달계에 미치는 영향에 대한 분석 - II

위의 결과를 바탕으로 이번에는 生肝健脾湯의 농도를 일정하게 유지하고 처리시간을 달리하면서 Akt 신호전달계에 미치는 영향을 분석하였다. HepG2 cell (1×10⁵cells/well)에 10µg/ml 농도의 生肝健脾湯을 투여하고, 각각 6, 12, 24시간이 지난 후 Akt의 인산화 정도를 Western blot analysis를 통해 측정하였다. 그 결과, 生肝健脾湯이 Akt의 인산화를 처리시간에 비례하여 증가시키는 것이 관찰되었다.

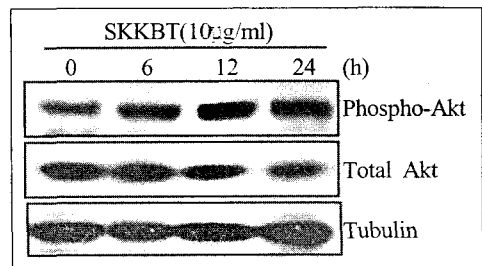


Fig. 8. Time-dependent increase in phosphorylation level of Akt (western blot analysis)

8. 生肝健脾湯이 NFκB 활성화에 미치는 영향에 대한 분석

生肝健脾湯의 농도에 따른 NFκB의 활성 정도를 측정하기 위하여 HepG2 cell(1×10⁵cells/well)에 각각

0, 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 生肝健脾湯을 투여하고, 24시간 이후 NF κ B의 nuclear translocation을 분석하였다. 핵질과 세포질에 있는 NF κ B의 양을 immunoblotting assay를 통해 각각 측정하고, 핵질에 있는 NF κ B 양과 세포질에 있는 NF κ B 양의 비를 구하였다. 또, 처리시간에 따른 NF κ B의 활성 정도를 측정하기 위하여, HepG2 cell(1×10^5 cells/well)에 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 生肝健脾湯을 투여하고, 각각 0, 3, 6, 12, 24시간이 지난 후 위와 동일한 방법으로 NF κ B 활성 정도를 측정하였다. 그 결과, 生肝健脾湯은 처리농도와 처리시간에 비례하여 HepG2 cell의 NF κ B의 활성을 증가시켰다.

9. 生肝健脾湯에 의한 Akt 및 NF κ B 활성화의 상호관계에 대한 분석

生肝健脾湯에 의한 Akt 및 NF κ B 활성화의 상호

관계를 분석하기 위해, PI3K 억제제인 LY294002를 주입하여 PI3K/Akt 신호전달계를 억제시킨 후 NF κ B의 활성 정도를 측정하였다. LY294002로 전처리한 HepG2 cell(1×10^5 cells/well)에 0, 1, 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 生肝健脾湯을 투여하고 24시간 뒤 Akt의 인산화 정도와 NF κ B의 활성 정도를 측정하였다. 그 결과, 生肝健脾湯에 의한 NF κ B의 활성화가 PI3K/Akt 신호전달계 억제제 투여에 의하여 완전히 차단되는 것이 확인됨으로써 生肝健脾湯에 의한 NF κ B 활성화는 PI3K/Akt 신호전달계의 활성화를 통하여 이루어짐을 확인할 수 있었다.

10. 生肝健脾湯에 의한 NF κ B 활성화와 세포활성과의 관계에 대한 분석

生肝健脾湯에 의한 HepG2 cell의 활성 증가 및 apoptosis 억제가 NF κ B 활성화와 관련된 것인지를 판단

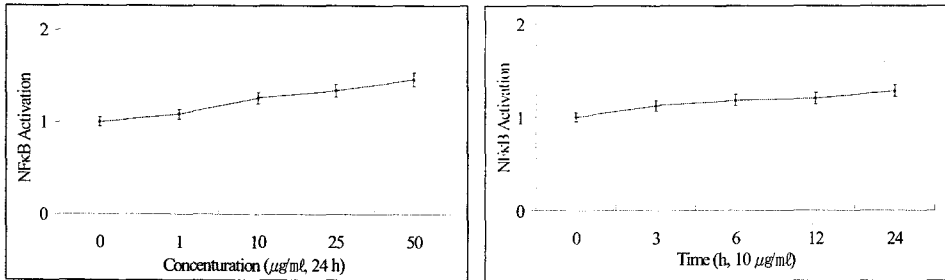


Fig. 9. Dose-dependent and time-dependent increase in NF κ B activation (immunoblotting assay)

; Each value represents relative ratio of nuclear NF κ B/cytoplasmic NF κ B when that of the control, SKKBT untreated, is set to 1.00.

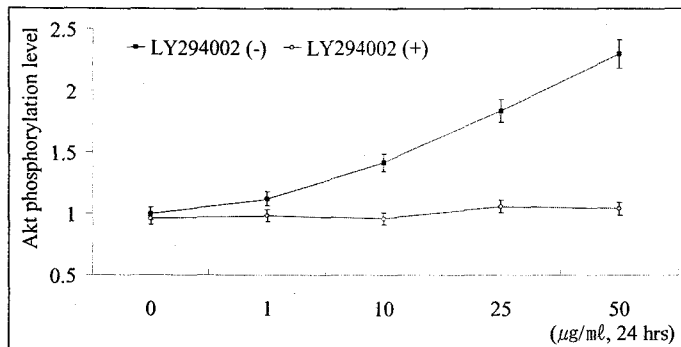


Fig. 10. LY294002 blocked phosphorylation of Akt

; Each value represents relative ratio of phospho-Akt/total Akt when that of the control is set to 1.00.

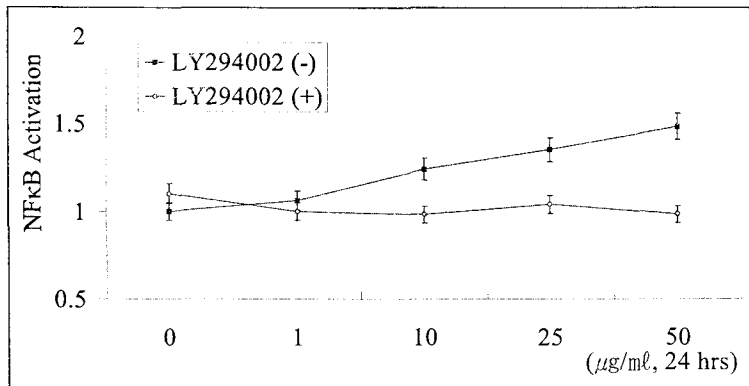


Fig. 11. LY294002 blocked nuclear translocation of NFκB

; Each value represents relative ratio of nuclear NFκB/cytoplasmic NFκB when that of the control is set to 1.00.

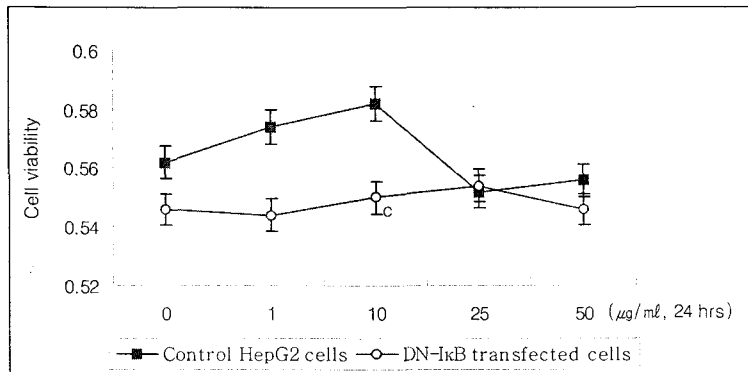


Fig. 12. DN-IκB reduced SKKBT effect on cell viability (MTT assay)

; Each value represents the exponent obtained from optic density and cell concentration

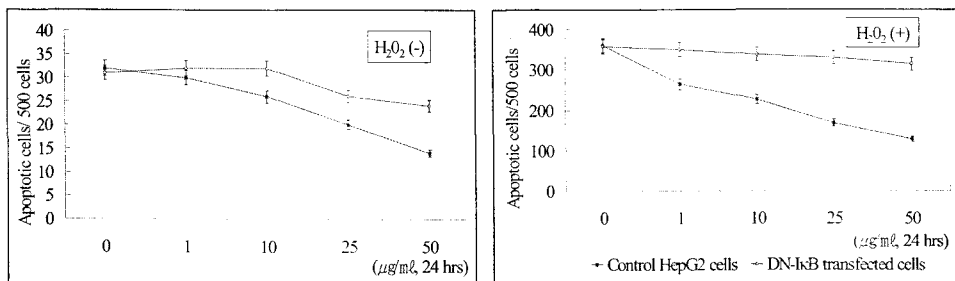


Fig. 13. DN-IκB reduced SKKBT effect on apoptosis (tryphan blue exclusion assay)

; Each value represents apoptotic cells/total cells counted (500).

하기 위하여, dominant negative IκB expression vector(DN-IκB)를 transfection하여 HepG2 cell의 NFκB의 활성화를 억제한 후에도 生肝健脾湯에 의해 세포

활성이 증가하고 H₂O₂에 의한 apoptosis가 억제되는지 관찰하였다.

HepG2 cell(1×10⁵cells/well)에 dominant negative

IκB expression vector (DN-IκB)를 transfection시키고, 0, 1, 10, 25, 50 μg/ml의 生肝健脾湯으로 24시간 처리한 후 MTT assay로 세포 활성을 측정하고, H₂O₂에 의한 apoptosis 정도를 trypan blue exculsion assay를 통해 측정하였다. 그 결과, NFκB 활성화가 억제될 경우 生肝健脾湯에 의한 효과가 나타나지 않음이 관찰되어, 세포 활성 증가 및 apoptosis 억제는 NFκB 활성화를 통하여 이루어짐이 확인되었다.

11. 세포분열조절 유전자 발현에 미치는 영향

현재까지 관찰된 生肝健脾湯에 의한 세포학적 현상이 유전자 발현의 변화에 의하여 야기될 가능성을 파악하기 위해 quantitative RT-PCR analysis를 통한 유전자 발현분석을 수행하였다. 대조군 및 약물 투여군으로부터 RNA를 추출하고 이로부터 cDNA를 합성한 후 관찰하고자 하는 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR products는 전기영동을 통하여 확인하고 유전자 발현량은 laser densitometer를 이용하여 정량하였다. 生肝健脾湯의 투여농도는 10 μg/ml로 하고 12, 24, 48시간 처리 후 유전자 각각의 발현에 대한 분석을 수행하였으며 동일한 과정을 2회 반복 실시하여 재연성이 높은 결과를 얻었다. 그 결과, 生肝健脾湯은 세포분열을 촉진시키는 것으로 알려진 c-Myc, Cyclin D1, CDK4 유전자의 발현에 영향을 미치지 않았으며, 또한 세포

분열을 억제시키는 것으로 알려진 p53, p21/Waf1, p27/Kip1, RB1, p16/INK4a 유전자의 발현에도 영향을 미치지 않았다.

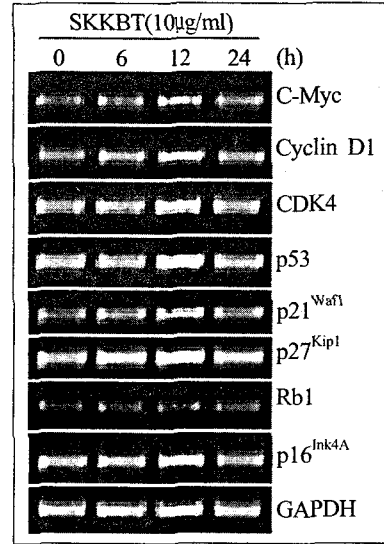


Fig. 14. SKKBT has no effect on expression of genes that regulate cell cycle in HepG2 cell (Quantitative RT-PCR analysis)

12. PI3K/Akt-NFκB 신호전달계 관련 유전자 발현에 미치는 영향

生肝健脾湯에 의한 PI3K/Akt-NFκB 신호전달계 활성화가 이와 관련된 유전자의 발현변화에 의하여

Table 3. Effect of SKKBT on Gene Expression Related to Cell Cycle Regulation in HepG2 Cell

Genes	SKKBT (hrs, 10 μg/ml)			
	0	12	24	48
c-Myc	1.00	1.06	0.98	0.98
Cyclin D1	1.00	0.92	0.96	0.92
CDK4	1.00	1.02	1.00	0.94
p53	1.00	1.06	0.98	1.02
p21/Waf1	1.00	1.02	0.96	1.04
p27/Kip1	1.00	1.04	0.98	0.96
RB1	1.00	1.04	0.96	1.02
p16/INK4a	1.00	0.98	0.96	1.04

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

야기될 가능성을 파악하기 위해 quantitative RT-PCR analysis를 통한 유전자 발현분석을 수행하였다. 각각의 세포군에서 RNA를 추출하고 이로부터 cDNA를 합성한 후 관찰하고자 하는 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR products는 전기영동을 통하여 확인하고 유전자 발현량은 laser densitometer를 이용하여 정량하였다. 生肝健脾湯의 투여농도는 10 μ g/ml로 하였으며 12, 24, 48시간 처리 후 유전자 각각의 발현에 대한 분석을 수행하였으며 동일한 과정을 2회 반복 실시하여 재현성이 높은 결과를 얻었다. 그 결과, 生肝健脾湯은 PTEN, PDK-1, Akt, NF κ B(p65), I κ B 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 반면 PIK3CA(PI3K의 catalytic subunit인 p110 α 의 유전자) 유전자의 mRNA 발현을 증가시키는 효과를 가지고 있음이 확인되었다.

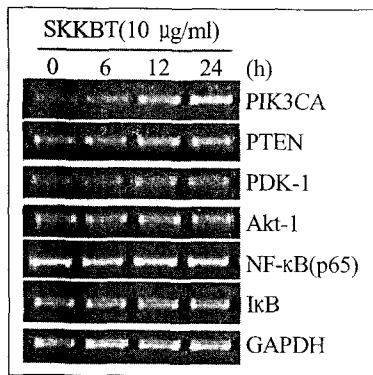


Fig. 15. SKKBt increased mRNA of PIK3CA gene (Quantitative RT-PCR analysis)

IV. 考 察

간질환은 최근 우리나라 사망원인별 사망순위에서 5위를 차지하고 있고, 특히 40대 남성에서는 악성신생물 다음으로 2위를 차지하고 있어¹, 여전히 만성 간질환에 의한 사망률이 매우 높은 것으로 보고되어 있다. 최근 십여년간 꾸준히 B형 간염 예방정책이 시행되면서 B형 간염 바이러스 보유율이 점차 감소하고는 있으나 여전히 우리나라 성인 인구의 약 5%에 이르고 있으며², 한편 과거 비교적 이환율이 낮았던 C형 간염 및 알코올성 간질환 환자의 발생은 점차 증가하고 있어^{3,4}, 이런 각종 간질환은 개인 뿐 아니라 사회적 차원에서도 지속적 관심을 가져야 할 문제로 남아있다.

한의학 문헌에서 黃疸은 바이러스성 간염, 간경변증의 증상과 관련되어 있다. 張仲景은 黃疸의 병인병리를 瘀熱在裏, 寒濕在裏, 蓄血이라 하였다. 瘀熱在裏에 의한 황달은 茵陳五苓散 등으로 다스리며, 寒濕在裏에 의한 황달은 加減胃苓湯 등으로 다스린다¹⁴. 生肝健脾湯은 이러한 理論 및 임상 경험을 통해 간질환에 활용하기 위해 만들어진 처방으로, 黃疸을 다스리는 要藥인 茵陳을 君藥으로 清利濕熱, 利尿, 健脾, 安胃 등의 효능을 가진 수종의 한약재를 사용하여 간의 生理機能을 平衡調理시켜주는 처방이다¹⁵.

본 실험에 사용된 生肝健脾湯은 실험적, 임상적 보고를 통해 치료 효능이 검증됐으나^{5,6,16}, 그 약리기전에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. 최근 한의

Table 4. Effect of SKKBt on Gene Expression Related to PI3K/Akt-NF κ B Signal Pathway in HepG2 Cell

Genes	SKKBt (hrs, 10 μ g/ml)			
	0	12	24	48
PIK3CA	1.00	1.32	1.66	1.98
PTEN	1.00	1.02	1.04	0.96
PDK-1	1.00	1.04	1.02	0.96
Akt-1	1.00	1.02	1.06	0.98
NF κ B(p65)	1.00	0.94	1.04	1.00
I κ B	1.00	0.96	0.96	1.04

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

학에서는 분자생물학적 기전을 규명함으로써 새로운 치료법을 모색하려는 노력이 활발하게 시도되고 있는데⁸⁻¹², 본 연구에서는 生肝健脾湯이 HepG 2 cell의 활성, 증식, DNA 복제, 세포분열주기, 사멸 및 관련 유전자들의 발현에 미치는 영향을 살핍으로써 生肝健脾湯의 간기능 보호 및 회복작용을 평가하고, 다양한 생체 반응에 관여하는 핵심적 전사조절자로 알려진 NFκB의 활성화 및 이를 조절하는 몇몇 상위 신호전달계에 미치는 영향을 분석하여 生肝健脾湯의 분자생물학적 기전을 규명하고자 하였다.

NFκB는 다양한 유전자 발현을 조절하는 전사 조절자로, 비활성화 상태에서는 inhibitor IκB와 함께 세포질 속에 있으며, inhibitor IκB는 NFκB가 핵 속으로 이동하는 것을 막아준다. 이 상태에서 활성화 야기 자극이 가해지면, IκB는 인산화 과정 후 분해되어 NFκB의 이동을 억제하지 못하게 되고, NFκB는 핵 속으로 이동한 후, target 유전자들의 전사(transcription)를 야기하게 된다¹⁷. NFκB는 여러 가지 cytokine과 mitogen들에 의해 활성화되어 여러 유전자들의 발현을 조절함으로써 세포의 다양한 반응을 매개하는 주요한 전사조절자로서 apoptosis를 억제하여 생존에 필수적 인자로 작용하는 것으로 알려져 있는데^{18,19}, 이러한 NFκB 활성화에 의한 apoptosis 억제 효과는 간세포에서도 발생한다^{20,21}. 한편, 부분적 간절제술 후 간의 재생 과정에 있어서도 NFκB의 활성화가 억제될 경우 간의 정상적 재생 과정을 거치지 못하고 과도한 apoptosis로 인한 세포 사멸이 발생하는 것으로 알려졌다²².

PI3K/Akt pathway는 다양한 extracellular survival factor에 의해 작용하여 세포 증식을 촉진하거나 apoptosis를 억제함으로써 세포 생존에 기여하는 신호전달계로²³, 신경계의 neuron²⁴, oligodendrocyte²⁵, 심근세포²⁶, 혈관평활근세포²⁷, 폐의 섬유모세포²⁸ 등 정상 조직 세포와, 각종 암세포의 생존 메커니즘이기도 하다²⁹⁻³¹. PI3K는 lipid kinase로 다양한 생존 신호에 의해 활성화되어 세포막의 phosphoinositide를 인산화시켜 PI-3,4,5-P3를 생산하는데, 이 과정은 lipid phosphatase의 하나인 PTEN의 탈인산화 작용에 의해 억

제될 수 있다³². PI-3,4,5-P3가 second messenger로 작용하여 세포질에 분포되어 있는 Akt를 세포막으로 이동시키면 PDK-1이 작용하여 Akt를 인산화시켜 활성화시킨다. 활성화된 Akt는 Bad³², caspase 9³³, forkhead transcription factors³⁴와 같은 apoptosis 관련 단백질을 인산화시켜 불활성화하거나, NFκB를 활성화시켜 Bcl-2 그룹에 속하는 Bfl-1/A1³⁵, caspase inhibitor인 c-IAP1 및 c-IAP2³⁶ 등의 유전자 발현을 촉진함으로써 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다³⁷.

MAPK(Mitogen-activated protein kinase) pathway 역시 세포의 성장, 분화, 염증, apoptosis 등의 반응을 매개하는 중요한 신호전달계로서, 포유류에 있어서는 MAPK/ERK pathway, SAPK/JNK pathway 및 p38 MAPK pathway가 알려져 있는데, ERK(Extracellular signal regulated kinase)는 주로 세포를 생존시키는 방향으로, JNK(Jun N-terminal kinase)와 p38 kinase는 주로 세포사멸을 유도함으로써, 세포는 MAPK pathway를 통해 세포의 성장과 억제가 균형을 이루게 된다³⁹.

본 실험에서는 MTT assay를 통해 生肝健脾湯이 0~10μg/ml에서 HepG2 cell의 cell viability를 증가 시킴을 확인하고, 生肝健脾湯이 HepG2 cell의 증식, DNA 복제, 세포분열주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각 cell counting analysis, [³H]-thymidine incorporation assay, flow cytometric analysis를 시행하였다. 그 결과, 生肝健脾湯은 HepG2 cell의 증식, DNA 복제 및 세포분열주기에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나, 生肝健脾湯의 간기능 보호 및 회복 작용이 간세포의 증식을 촉진함으로써 나타나는 것이 아님을 알 수 있었다.

한편, 生肝健脾湯이 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 trypan blue exclusion assay를 시행한 결과, etoposide 및 H₂O₂에 의한 HepG2 cell의 apoptosis가 生肝健脾湯에 의해 농도의존적으로 현저히 억제되는 것을 확인하였으며, 生肝健脾湯이 Akt, Erk, JNK의 인산화에 미치는 영향을 검사한 결과 Erk, JNK의 인산화에는 영향을 미치지

않는 반면, Akt의 인산화를 증가시켰고, 또, 처리농도 및 시간에 비례하여 NFκB의 nuclear translocation을 증가시켰다.

PI3K 억제제인 LY294002를 주입하여 PI3K/Akt 신호전달계를 차단하였을 때, 生肝健脾湯에 의한 NFκB의 활성화는 완전히 차단되는 것을 확인하였고, dominant negative IκB expression vector(DN-IκB)를 transfection하여 NFκB의 활성을 억제시키면 生肝健脾湯에 의한 apoptosis억제 및 cell viability 증가 효과 또한 나타나지 않는 것을 확인하여 生肝健脾湯이 PI3K/Akt 신호전달계를 통해 NFκB의 활성화시킴으로써 apoptosis를 억제하고 cell viability를 증가시킴을 알 수 있었다.

또, 生肝健脾湯이 PI3K/Akt-NFκB 신호전달계 관련 유전자 중 PTEN, PDK-1, Akt-1, NFκB(p65), IκB 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 PIK3CA (PI3K의 catalytic subunit인 p110α의 유전자) 유전자의 mRNA 발현을 촉진시키는 것을 확인하였다.

결과적으로 生肝健脾湯은 PI3K/Akt 신호전달계를 통해 NFκB를 활성화시킴으로써 간세포의 cell viability를 증가시키고 apoptosis를 억제하며, PIK3CA 유전자의 발현 증가는 生肝健脾湯이 PI3K/Akt 신호전달계를 작동시키는 중요한 기전으로 보여진다.

V. 結 論

生肝健脾湯의 효능을 평가하기 위해 生肝健脾湯이 HepG2 cell의 세포 활성, 증식, DNA 복제, 세포 분열주기, apoptosis에 미치는 영향을 조사하였고, 그 분자생물학적 매커니즘을 파악하기 위해 세포의 성장·분화·사멸 등 각종 반응을 매개하는 여러 신호전달계(PI3K/Akt, MAPK/ERK, SAPK/JNK)에 미치는 영향과 세포분열조절과 관련된 유전자들(c-Myc, Cyclin D1, CDK4, p53, p21/Waf1, p27/Kip1, RB1, p16/INK4a)의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 生肝健脾湯은 0.1~50μg/ml의 농도에서는 HepG2

- cell에 세포독성을 일으키지 않았으며, 0.1~10μg/ml의 농도에서 HepG2 cell의 활성을 증가시켰다.
2. 生肝健脾湯은 HepG2 cell의 증식, DNA 복제 및 세포분열주기에 영향을 미치지 않았다.
3. 生肝健脾湯은 HepG2 cell의 자연적인 apoptosis는 물론 DNA 손상유발 chemical(Etoposide) 및 reactive oxygen radical(H₂O₂)에 의한 apoptosis를 처리농도에 비례하여 억제시켰다.
4. 生肝健脾湯은 PI3K/Akt 신호전달계를 활성화시키는 반면 MAPK/ErK 및 SAPK/JNK 신호전달계에는 영향을 미치지 않았다.
5. 生肝健脾湯은 NFκB의 활성을 처리농도 및 시간에 비례하여 증가시켰다.
6. PI3K 억제제인 LY294002를 주입하여 PI3K/Akt 신호전달계의 활성화를 억제시켰을 때, 生肝健脾湯에 의한 NFκB의 활성화는 완전히 차단되었다.
7. Dominant negative IκB expression vector(DN-IκB)를 transfection하여 NFκB의 활성화를 억제시키면, 生肝健脾湯에 의한 apoptosis억제효과는 나타나지 않았다.
8. 生肝健脾湯은 HepG2cell의 세포분열조절과 관련된 유전자들인 c-Myc, Cyclin D1, CDK4, p53, p21/Waf1, p27/Kip1, RB1, p16/INK4a의 발현에는 영향을 미치지 않았다.
9. 生肝健脾湯은 PI3K/Akt-NFκB 신호전달계 관련 유전자 중 PTEN, PDK-1, Akt, NFκB(p65), IκB 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 PIK3CA(PI3K의 catalytic subunit인 p110α의 유전자) 유전자의 mRNA 발현을 촉진시켰다.

이상의 결과에서 生肝健脾湯은 HepG2 cell의 활성을 증가시키고, 자연적인 apoptosis 및 DNA 손상 유발 chemical 및 reactive oxygen radical에 의한 apoptosis를 억제하며, 이와 같은 현상은 生肝健脾湯이 PIK3CA 유전자의 mRNA 발현을 촉진함으로써 p110α를 증가시키고, PI3K/Akt-NFκB 신호전달계를 활성화시키는 기전에 의한 것으로 나타났다. 향후, 활성화된 NFκB가 어떠한 유전자의 발현을 조절

하여 apoptosis를 억제시키는데에 관하여서는 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 통계청. 2004년 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2003.
2. 주광로, 방성조, 송병철, 윤광희, 주연호, 양수현, 김기락, 정영화, 이영상, 서동진. 1990년대 후반 한국 성인의 B형 간염 바이러스 표지자 보유양상. 대한소화기학회지. 1999;33:642-52.
3. 한요셉, 김병호, 백일현, 이등근, 김경진, 동석호, 김효중. 1990년대 간경변증의 원인, 합병증, 사망원인의 변화에 관한 고찰. 대한간학회지. 2000; 6:328-39.
4. 변관수. 알코올성 간질환의 임상 및 병리학적 측면. 대한간학회지. 1997;3:307-15.
5. 김병운. 生肝健脾湯이 간장의 대사와 재생능력에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 1981.
6. 김병운. 만성간염 3136례에 대한 임상분석과 生肝健脾湯의 치료효과. 전국 한의학 학술대회. 1982:218-25.
7. 윤여광, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 인체간세포의 glutathione 생성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):81-91.
8. 한창우, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NFκB 활성화 및 세포사멸에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):59-70.
9. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳淸肝湯加味方이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(1):145-64.
10. 표임정, 이장훈, 우홍정. 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1999;22(1):119-40.
11. 이지현, 이장훈, 우홍정. 茵陳분획물이 인체간세포의 TGF-β1 induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;20(1):53-61.
12. 강우성, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳淸肝湯이

HepG2 cell의 TNF-α 신호전달계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):28-45.

13. 식품의약품안전청. 대한약전의한약(생약)규격집. 서울: 동원문화사;2002 p43, 58, 65, 110, 147, 178, 185, 242, 274, 286, 310, 501, 513, 522, 536, 566, 610, 614, 700.
14. 전국한외과대학 간계내과학교수 공저. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원. 2001, p118.
15. 김병운. 生肝健脾湯이 간장의 대사와 재생능력에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 1981.
16. 김병운. 간염유관항원양성 만성 간질환 2례. 동양의학. 1978;10:43-4.
17. Baeuerle PA, Baltimore D. NFκB: ten years after. Cell. 1996;87:13-20.
18. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science. 1996;274:782-4.
19. 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.
20. 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.
21. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. Science. 1999;284:321-5.
22. Imuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, Brenner DA. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. J Clin Invest. 1998;101:802-11.
23. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis. 2004;9(6):667-76.
24. Hui L, Pei DS, Zhang QG, Guan QH, Zhang

- GY. The neuroprotection of insulin on ischemic brain injury in rat hippocampus through negative regulation of JNK signaling pathway by PI3K/Akt activation. *Brain Res.* 2005;1052(1):1-9.
25. Zaka M, Rafi MA, Rao HZ, Luzi P, Wenger DA. Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Neurosci.* 2005;30(3):398-407.
 26. Naito AT, Akazawa H, Takano H, Minamino T, Nagai T, Aburatani H, Komuro I. Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ Res.* 2005;97(2):144-51.
 27. Baldini PM, De Vito P, D'aquilio F, Vismara D, Zalfa F, Bagni C, Fiaccavento R, Di Nardo P. Role of atrial natriuretic peptide in the suppression of lysophosphatidic acid-induced rat aortic smooth muscle (RASM) cell growth. *Mol Cell Biochem.* 2005;272(1-2):19-28.
 28. Etscheid M, Beer N, Dodt J. The hyaluronan-binding protease upregulates ERK1/2 and PI3K/Akt signalling pathways in fibroblasts and stimulates cell proliferation and migration. *Cell Signal.* 2005;17(12):1486-94.
 29. Hartmann C, Bartels G, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A. PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005;109(6):639-42.
 30. Michl P, Downward J. Mechanisms of Disease: PI3K/AKT Signaling in Gastrointestinal Cancers. *Z Gastroenterol* 2005;43(10):1133-9.
 31. Lee YR, Park J, Yu HN, Kim JS, Youn HJ, Jung SH. Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor-alpha, but not estrogen receptor-beta, and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336(4):1221-6.
 32. Lian Z, Di Cristofano A. Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene.* 2005;24(50):7394-400.
 33. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91(2):231-41.
 34. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998;282(5392):1318-21.
 35. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999;96(6):857-68.
 36. Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gelinas C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13(4):382-7.
 37. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998;281(5383):1680-3.
 38. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999;13(22):2905-27.
 39. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999;19(4):2435-44.