대한한의학회지 : 제19권 제1호
K.O.M.S. Vol. 19. No. 1. 1998

茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響

朴容禛·金榮哲·李長勳·禹弘楨*

ABSTRACT

The Effect of Injinchunggantang-derivative on Proliferation of Hepatocyte

Yong-Jin Park(O.M.D.), Young-Chul Kim(O.M.D., Ph.D.),
Jang-Hoon Lee(O.M.D.,Ph.D.) and Hong-Jung Woo(O.M.D.,Ph.D.)
Dept. of 1st Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

The purpose of this study is to evaluate the effect of Injinchunggantang-derivative on proliferation of hepatocyte in rats. Cell viability is studied by MTT assay. The gene related to cell replication such as p53, waf1, bcl-2 and bcl-x_L is quantitized by quantitative RT-PCR and the proteins coded by these genes are studied by Western blotting. The results are as follows.

1. The hepatocytes cultured in medium with Injinchunggantang-derivative showed better viability compared with control group in MTT assay, and the hepatocytes cultured in medium with the Injinchunggantang-derivative-and-ethanol-mixed group showed better viability than the hepatocytes cultrued in 10% ethanol culture medium(control group), noting that Injinchunggantang-derivative has protective effect on hepatocyte injury. There was no dose- and time-dependence.

2. In quantitative RT-PCR,

i) Bcl-2 gene increased significantly both in Injinchunggantang-derivative group and in Injinchunggantang-derivative-and-ethanol-mixed group, while it showed no significant increase or decrease in other group.

ii) Bcl-x_L gene increased significantly in Injinchunggantang-derivative group as well as in Injinchunggantang-derivative-and-ethanol-mixed group.

* 경희대학교 한의과대학 내과학교실

iii) P53 gene showed no significant increase or decrease in hepatocytes cultured in medium with 10% ethanol and in hepatocytes cultured in medium with Injinchunggantang-derivative-and-ethanol-mixed group, suggesting that 10% ethanol induced cell toxicity, thus increased p53 gene expression.

iv) Waf1 gene showed no significant increase or decrease in hepatocytes cutured in medium with Injinchunggantang-derivative, while increased in hepatocytes cultured in medium with 10% ethanol and in hepatocytes cultured in medium with Injinchunggantang-derivative-and-ethanol-mixed group, suggesting that 10% ethanol induced cell toxicity increased waf1 gene expression.

3. In the study on protein by western blotting, the band of bcl-2 and bcl-x_L were widened in Injinchunggantang-derivative group. Especially the amount of bcl-x_L increased significantly compared with other groups. But in the study on p53 and waf1, there was no significant difference among those groups.

Above study shows that Injinchunggantang-derivative has good effect on cell viability and that the genes resistant to cell death such as bcl-2 and bcl-x_L are induced by Injinchunggantang-derivative to resist to cell death by toxic agent. And this is reconfirmed in protein study using western blotting. These results suggest that Injinchunggantang-derivative has inhibitory effect on cell death as well as protective effect on hepatocyte. Therefore this prescription is recommended in various liver diseases such as chronic liver disease and drug-induced hepatic injury.

I. 緖 論

우리나라는 肝炎바이러스에 의한 慢性肝疾患의 罹患率이 매우 높으며 특히 B型 肝炎바이러스 保有者는 成人의 약 10%[5,15,16]에 이르는 것으로 알려져 있다. 또한 肝臟疾患으로 인해 死亡하는 患者가 차지하는 比率은 우리나라 全體 死亡原因 중 4位를 차지하며 40~49歲 成人 男子의 경우 人口 100,000名當 98.8名이 肝臟疾患으로 死亡하고 있는 實情이다[7].

韓醫學에서 肝疾患에 대한 內容은 文獻上 主로 黃疸, 脹滿, 積聚 등[1,8~10]에 잘 나타나 있고, 이 중 바이러스性肝炎의 症候는 黃疸[1,30,31]에서 찾아볼 수 있다. 黃疸의 原因[24,25]은 濕熱熏蒸, 寒濕在裏 등이며, 治法으로는 淸熱利濕이 根幹이 되고, 代表的인 治療處方으로는 茵陳五苓散[24,25]이 있다.

本 實驗에 使用된 茵陳淸肝湯加味方은 張[24]이 濕熱黃疸의 治療를 目的으로 使用한 茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고 地楡 蘿蔔子 靑皮 砂仁과 三稜 蓬朮 및 茜草根 鳥犀角을 加하여 現在 臨床에서는 慢性肝疾患의 治療에 淸熱利濕, 消積祛瘀를 目標로 널리 使用되고 있는 處方[9,11,12,13]이다.

茵陳淸肝湯에 대한 硏究로는, 禹[9]가 慢性B型肝炎 患者에 대한 臨床硏究를 通하여 茵陳淸肝湯이 AST, ALT등의 血淸學的 檢査上의 改善과 HBeAg의 陰轉에 效果가 있다고 報告하였고, 金[11]은 茵陳淸肝湯의 安全性에 關한 硏究에서 急性·亞急性·慢性 經口毒性 및 어떠한 副作用도 나타내지 않았다고 報告하였다. 또한 金[12]이 茵陳淸肝湯이 電擊性肝炎을 일으킨 마우스의 生存率

을 53%로 높이는 效果가 있다고 報告하였고, 姜[13]은 茵陳淸肝湯加味方이 마우스肝炎바이러스와 水浸스트레스로 誘發한 마우스의 肝硬變症에 있어 肝機能改善 및 肝損傷恢復에 有意한 效果가 있다고 報告하였다.

이와 같이 茵陳淸肝湯의 効能에 關한 實驗的 硏究는 繼續되었으나 지금까지의 硏究는 分子生物學的인 接近이나 遺傳子의 發現과 韓藥과의 關係를 究明하려는 試圖는 微微한 實情이다. 또한 細胞의 增殖能은 여러 生物學的 特性 중에서도 臨床的 結果와 關係가 깊은 指標로 알려져 있으므로[14,17,19,20] 앞으로의 硏究方向에 分子生物學的인 接近이 반드시 必要할 것으로 思料된다.

이에 著者는 茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響을 分子生物學的인 方法으로 檢證하고자 마우스의 肝細胞를 分離한 後 混合培地에서 培養하고 茵陳淸肝湯加味方과 10% ethanol을 處理하여 細胞의 生存能力을 測定하는 MTT 酵素反應檢査와 細胞의 增殖能力에 대한 指標로 알려져있는 遺傳子[40,45,48]인 bcl-2, bcl-x_L, p53, waf1을 抽出하여 逆轉寫 重合酵素連鎖反應으로 測定하고, 各 遺傳子의 發顯으로 因한 蛋白質의 生成程度를 把握하기 위한 western blotting을 통해 有意한 結果를 얻었기에 이를 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

(1) 藥材

本 實驗에 使用한 藥材는 韓藥規格集에 根據하여 慶熙醫療院 韓方病院 藥劑科에서 嚴選한 것을 購入하여 使用하였으며 處方의 內容과 用量은 다음과 같다.

Table. 1 Prescription of Inchinchunggantang-derivative

構成藥物	生 藥 名	用量
茵 陳	Artermisiae Capillaris Herba	25g
地 楡	Sanguisorbae Radix	8g
白 朮	Atractylodis Rhizoma Alba	6g
猪 苓	Ployporus	6g
茯 苓	Hoelen	6g
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	4g
蘿蔔子	Raphani Semen	4g
靑 皮	Aurantii Immatri Pericarpium	3g
三 稜	Scirpi Tuber	3g
蓬 朮	Zeloariae Rhizoma	3g
砂 仁	Amomi Semen	3g
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3g
茜草根	Rubiae Radix	6g
烏犀角	Bubalus Bubalis	6g
	Total	86g

(2) 檢液의 調製

實驗에 使用한 檢液의 調製는 5貼 分量, 總 試料 430g을 3次蒸溜水 8ℓ로 2時間 동안 2回 還流抽出한 後 綿으로 濾過하여 그 濾液을 80℃ 물 重湯위에서 減壓 濃縮하고, 凍結乾燥器(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 利用하여 82.0g의 乾燥抽出物을 얻어 19.07%의 收率을 보였다.

(3) 動物

血淸檢査로 부터 其他感染이 認定되지 않는 무게 약 20~30g의 4週齡 ICR 마우스 암컷(三育實驗動物硏究所)을 使用하였다.

2. 方法

(1) 肝細胞의 分離 및 培養

무게 20~30g의 마우스를 ether로 痲醉시킨 후 腹腔을 切開하여 肝의 門靜脈에 catheter를 挿入

하였다. Catheter를 통하여 50㎖의 calcium이 包含되지 않은 cold Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)을 흘려 肝內의 赤血球를 洗滌하고, 다시 37℃의 HBSS 20㎖로 洗滌하였다. HBSS로 肝을 洗滌한 後 0.2% type Ⅳ collagenase 50㎖로 perfusion시켜 肝을 支持하고 있는 纖維性 間質로부터 肝細胞를 分離시켰다. Collagenase로 分離된 肝細胞를 다시 sieve를 通過시켜 완전히 分離되지 않은 纖維質과 細胞덩어리를 除去하였다. Sieve를 通過한 肝細胞를 回收하여 HBSS로 洗滌한 後 800rpm에서 5分間 遠心分離하는 過程을 2回 反復하였다. 洗滌이 끝난 肝細胞는 RPMI 1640 90%와 Fetal Bovine Serum(FBS) 10%의 混合培地에서 培養하였다.

(2) 肝細胞에 대한 藥物處理

凍結乾燥된 藥劑 1g을 100㎖의 3次蒸溜水에 녹여 125℃에서 20分間 滅菌하였다. 滅菌된 藥物을 10㎕/㎖, 50㎕/㎖, 100㎕/㎖의 濃度로 投與하고 各各 6時間, 12時間, 24時間, 36時間, 48時間, 60時間, 72時間이 經過한 後 0.1% trypsin으로 細胞를 回收하여 protein, DNA, RNA를 抽出하였다.

肝細胞에 대한 藥物 損傷의 誘發은 10% ethanol이 包含된 培地에서 6時間 刺戟한 後 正常 培地로 交換하여 18時間 後에 測定하였다.

Ⅲ. 實驗

1. MTT 反應實驗

(1) MTT 溶液製作 및 處理

MTT 5㎎/㎖을 PBS(phosphate buffer saline)에 녹여 pH 7.5로 맞춘 後 0.22㎛의 filter로 濾過하여 stock solution을 만들었다. 그 後 10^4개의 細胞를 包含하고 있는 100㎕의 cell suspension에 10㎕ 의 MTT stock solution을 添加하였다.

(2) 酵素反應과 免疫螢光測定

MTT stock solution에 cell suspension을 添加한 狀態로 37℃에서 3時間 保存한 後 100㎕의 0.04M HCl in absolute isopropanol을 各各의 well에 넣고 잘 混合하여 blue formazan crystals을 完全히 溶解시켰다. 酵素의 溶解가 끝난 뒤 570 nm에서 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader로 OD(optical density)를 測定하였다.

2. 定量 RT-PCR

(1) RNA의 抽出

① GSS solution의 製作

250g의 guanidine isothiocyanate을 293ml의 3次 蒸溜水에 넣은 後 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 넣어 65℃에서 stirring한 後 filtering하여 滅菌하였다.

② Solution D의 製作

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 濃度로 넣어 製作하였다.

③ 10^7개의 細胞에 solution D 500㎕, 2M sodium acetate, pH 4.0 50㎕ 를 넣어 잘 混合한 後 water-saturated phenol 500㎕, chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 100㎕를 넣어 10秒間 vortexing하여 ice에 15分間 放置하였다.

④ 混合溶液을 15000rpm에서 20分間 遠心分離하여 上淸液의 4/5를 回收하여 同量의 cold isopropanol 1000㎕를 넣어 -70℃에서 24時間 沈澱시켰다.

⑤ 15000rpm에서 20分間 遠心分離하여 溶液을 除去한 後 RNA pellet을 100% ethanol과 70% ethanol로 洗滌한 後 30㎕의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 利用하여 RNA의 量을 測定하였다.

(2) c-DNA의 製作

① 다음과 같은 造成으로 試料를 混合하였다.

Reverse transcriptase buffer 2㎕

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

② 混合溶液이 20㎕가 되도록 sterile water를 添加한 後 42℃에서 15分間 放置하였다.

③ 各 試料에 80㎕의 물을 넣어 混合한 後 PCR 反應에 利用하였다.

(3) Primer의 製作

大田 大德硏究團地에 位置한 Bionia社에 依賴하여 製作된 Primer를 購入하여 使用하였다.

① GAPDH
: Glyceraldehyde-3-P-Dehydrogenase

② bcl-2
: (sense) 5′-CTT TGA GTT CGG TGG GGT CAT GTG -3′
(antisense) 5′-TGA CTT CAC TTG TGG CCC AGA TAG -3′

③ bcl-x_L
: (sense) 5′-GTG AGT GGA CGG TCA GTG -3′
(antisense) 5′-TTG GAC AAT GGA CTG GTT GA -3′

④ p53
: (sense) 5′-TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC -3′
(antisense) 5′-TTG GGC ACT GCT CGC TTA GTG CTC C-3′

⑤ Waf1
: (sense) 5′-CGT GAT TGC GAT GCG CTC AT -3′
(antisense) 5′-GCG CTT GGA GTG ATA GAA ATG -3′

(4) RT-PCR의 反應과 定量化

① 各 c-DNA를 對象으로 다음과 같이 試料를 混合하였다.

10x amplification buffer	10㎕
mixture of dNTP (10 pM)	5㎕
GAPDH primer 1 (10 pM)	2㎕
GAPDH primer 2 (10 pM)	2㎕
template c-DNA	4㎕
H_2O	77㎕

② GAPDH primer를 利用하여 다음의 條件으로 PCR反應을 施行하였다.

First cycle

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

Subsequent cycle

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

Last cycle

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

③ PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10分間 電氣泳動한 後 densitometer를 利用하여 各 band의 밝기를 定量化하였다.

④ 1次 PCR反應의 結果를 土臺로 RNA의 量을 增減하여 모든 GAPDH PCR products의 量을 ±20%內로 定量化 하였다.

⑤ 위의 結果를 바탕으로 target 遺傳子에 대한 PCR反應을 施行하여 相對的인 定量化를 施行하였다.

3. Western blotting

(1) 細胞準備와 緩衝溶液의 製作

① Cell washing and scraping into ice-cold PBS (pH 7.4)

② Cell pellet (400rpm, 10 min)

③ Resuspension in lysis buffer;

NaCl 0.15M
Tris 10mM (pH 7.4)
EDTA 5 mM
Triton X-100 1%

Protease inhibitors;

Phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM
Aprotinin 0.23 unit/ml
Leupeptin 10 μM
Benzamidine 1 mM

④ Incubation on ice for 10 min.

⑤ Centrifuge (16,000rpm, 20 min) and protein quantitation

⑥ Recover supernatant (cell lysate)

⑦ Add equal volume of 2× SDS sample buffer[2)]

⑧ Heating at 95°C for 5 min

(2) 電氣泳動과 blotting

① 電氣泳動[3)]

Polyacrylamide gel: 10-20%
100 μg of lysate protein per lane

② Blotting : blotting buffer는

20mM Tris
190mM Glycine
20% Methanol
Voltage: 100 V, 1hr, 4°C

(3) Detection

① Wash membrane with PBS for 5 min(50 ml)

② Incubate in Blocking Buffer for 30-60 min (50 ml)

③ Dilute primary antibody in Blocking Buffer (10 ml)

④ Incubate with primary antibody for 30-60 min (10 ml)

⑤ Wash for a minimum of 2 × 5 min in Wash Buffer (50 ml per wash)

⑥ Dilute biotinylated secondary Ab 1 : 20,000 in Blocking Buffer(1$\mu\ell$ of secondary antibody in 20 ml of Blocking Buffer)

⑦ Incubate with diluted secondary antibody for 30 min

⑧ Wash for a minimum of 2 × 5 min in Wash Buffer (50 ml per wash)

⑨ Dilute Avid-AP conjugate 1:20,000 in Bloc- king Buffer(1$\mu\ell$ of Avid-AP conjugate in 20 ml of Blocking Buffer)

⑩ Incubate with diluted conjugate for 20 min.

⑪ Wash for a minimum of 3 × 5 min in Wash Buffer (50 ml per wash)

⑫ Incubate for 5 min in Alkaline phosphatase Substrate Solution (5 ml)

Ⅳ. 成 績

1. MTT assay

MTT酵素와 blue formazan crystals를 反應시킨 後 ELISA를 利用한 測定結果는 Table. 2에 表로 作成하였다.

2) * SDS sample buffer : 0.125M Tris-HCl(pH 6.8) 4% SDS, 20% Glycerol, 5% 2-ME

3) * Ref; Cell Growth & Differ 2:235-243, 1991
Anal Biochem 150:76-85, 1985
Cancer Res 51:6529-6538, 1991 (0)

1) Normal群, control群과 茵陳淸肝湯加味方處理群의 比較

Normal群과 10% ethanol을 處理한 control群의 境遇 全 時間帶別로 OD의 差異가 두드러져 control群에서 細胞毒性에 의한 生存能力의 低下가 觀察되었다(Fig. 1). Normal群과 control群 외에 10㎕/㎖, 50㎕/㎖, 100㎕/㎖의 3가지 濃度別韓藥處理群을 6時間, 12時間, 24時間, 36時間, 48時間, 60時間, 72時間의 7가지의 時間別로 觀察하였다. 茵陳淸肝湯加味方만을 處理하여 濃度別, 時間別로 觀察한 結果, 10㎕/㎖群에서는 normal群과 比較하여 24時間, 36時間에서는 活性이 높았고 나머지 時間帶에서는 낮았으나, 全體的인 活性에 있어 normal群과는 크게 差異가 나지 않았다(Fig. 2). 50㎕/㎖群에서는 normal群과 比較하여 24時間에서 活性이 크게 低下되었으나 一時的인 現象으로 보이며, 나머지 時間帶에서 活性은 48時間에서 normal群보다 活性이 增加하는 등 크게 差異가 나지 않았다(Fig. 3). 100㎕/㎖群에서는 normal群과 比較하여 12時間, 24時間帶에서 活性이 比較적 低下되었으나 역시 一時的인 現象으로 보이며 48時間에서 normal群보다 活性이 增加하는 등 normal群과 크게 差異가 나지 않았다(Fig. 4). 全體的으로 茵陳淸肝湯加味方處理群은 control群보다 活性이 높았으나 normal群에 비해서는 時間別 活性度는 거의 有意性이 없었고, 濃度別 活性度는 低濃度에서 高濃度보다 相對的으로 높았으나 特別한 意味는 없었다.

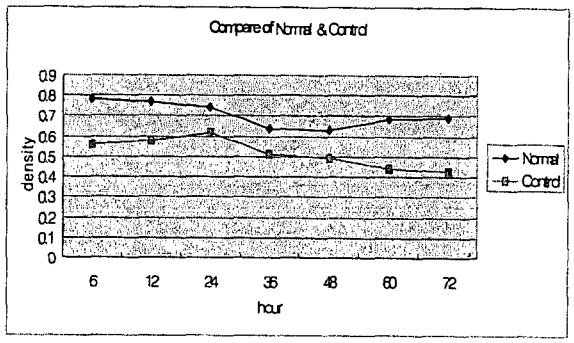


Fig. 1 MTT contrast of non-treated and 10% ethanol treated cell

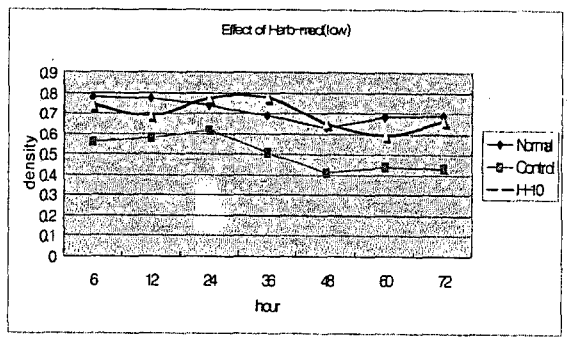


Fig. 2 MTT contrast of non-treated, 10% ethanol treated and low Injinchunggantang-derivative(10㎕/㎖)

Table. 2 The effect of Injhinchunggantang-derivative, 10% ethanol and mixed material to primary cultured cells in MTT assay.

		6hr	12hr	24hr	36hr	48hr	60hr	72hr
Normal		0.78*	0.77	0.74	0.69	0.63	0.68	0.69
한약제제	10㎕/㎖	0.74	0.69	0.77	0.78	0.65	0.59	0.66
	50㎕/㎖	0.72	0.74	0.56	0.68	0.73	0.66	0.54
	100㎕/㎖	0.67	0.59	0.58	0.64	0.71	0.65	0.69
Control (10% ethanol treated)		0.56	0.58	0.62	0.51	0.49	0.44	0.43
10% ethanol + 한약제제	10㎕/㎖	0.64	0.69	0.61	0.66	0.63	0.58	0.55
	50㎕/㎖	0.61	0.67	0.59	0.63	0.58	0.58	0.54
	100㎕/㎖	0.64	0.59	0.63	0.57	0.55	0.52	0.53

* : Densitometer로 測定한 結果임.

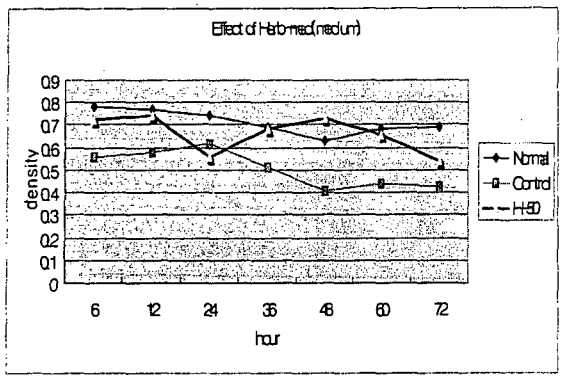


Fig. 3 MTT contrast of non-treated, 10% ethanol treated and middle Injinchunggantang-derivative(50㎕/㎖)

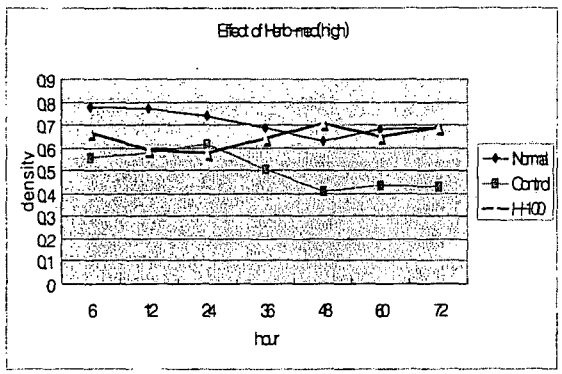


Fig. 4 MTT contrast of non-treated, 10% ethanol treated and high Injinchunggantang-derivative(100㎕/㎖)

(2) Control群(10% ethanol處理群) 및 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方 混合製劑와의 結果比較

Control群 및 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方 混合製劑를 10㎕/㎖, 50㎕/㎖, 100㎕/㎖의 3가지의 濃度別과 6時間, 12時間, 24時間, 36時間, 48時間, 60時間, 72時間의 7가지 時間別로 觀察하였다. 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方 混合製劑의 10㎕/㎖群은 control群보다 24時間에서 活性度가 약간 떨어진 것을 除外하고 比較적 活性이 높게 維持되었고, 時間의 進行과는 크게 有意性이 없었다(Fig. 5). 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方의 混合製劑 50㎕/㎖에서는 control群보다 역시 24時間에서 活性이 떨어졌으나 全般的으로 活性度는 有意性있게 높았으며, 時間의 進行과는 크게 有意性이 없었다(Fig. 6). 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方의 混合製劑 100㎕/㎖에서는 control群보다 6時間, 12時間, 24時間에서 活性度가 약간씩 떨어졌으나 全般的으로 活性度는 有意性있게 높았으며, 時間의 進行과는 크게 有意性이 없었다(Fig. 7). 全體的으로 時間別 活性度는 意義가 없었고, 濃度別 活性度는 低濃度에서 高濃度보다 相對的으로 높았으나 特別한 意味는 없었다.

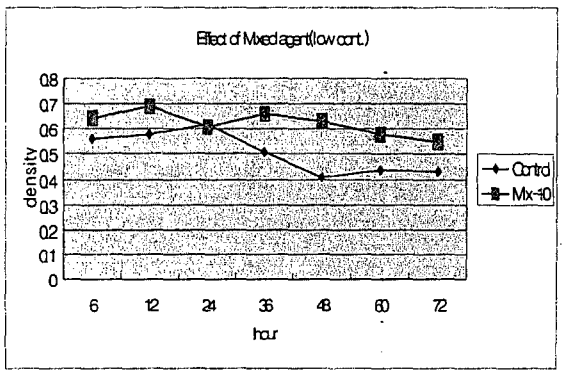


Fig. 5 MTT contrast of 10% ethanol treated and low concentration Mixed material agent (10㎕/㎖)

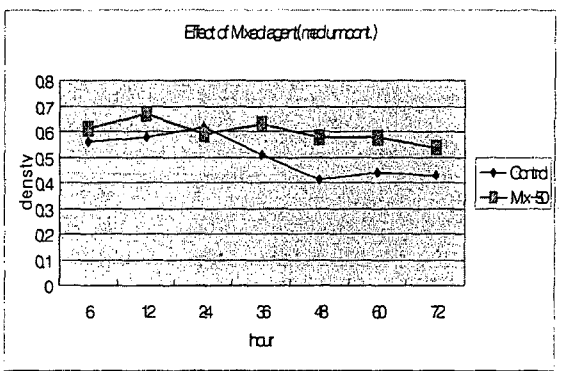


Fig. 6 MTT contrast of 10% ethanol treated and medium concentration Mixed material agent (50㎕/㎖)

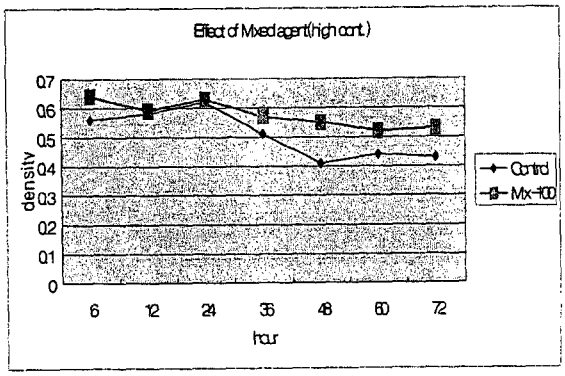


Fig. 7 MTT contrast of 10% ethanol treated and high concentration Mixed material agent (100㎕/㎖)

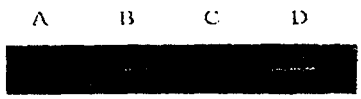
2. 定量 RT-PCR

.RNA를 抽出하여 cDNA 및 Primer를 製作한 後 PCR反應을 施行하고 電氣泳動을 거쳐 모든 product를 densitometer로 定量化하였다. 各各의 density를 定量化한 結果 bcl-2는 normal群 - 茵陳淸肝湯加味方處理群 -control群- 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方의 混合製劑群의 順序로 540-985-572-969이 나타나 茵陳淸肝湯加味方處理群과 混合製劑群이 normal群과 control群에 비해 顯著히 活性度가 增加하였다(Fig. 8). Bcl-x_L은 normal群 -茵陳淸肝湯加味方處理群 -control群 -10% control과 茵陳淸肝湯加味方의 混合製劑群의 順序로 526-870-578-897이 나타나 茵陳淸肝湯加味方處理群과 混合製劑群이 normal群과 control群에 비해 顯著히 活性度가 增加하였다(Fig. 9). p53은 normal群 -茵陳淸肝湯加味方處理群 - control群 - 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方의 混合製劑群의 順序로 544-525-665-748이 나타나 茵陳淸肝湯加味方處理群이 normal群에 비해 거의 意味없는 結果를 보였으며, 오히려 control群과 混合製劑群에서 약간의 活性增加를 보였다(Fig. 10). Waf1은 normal群 - 茵陳淸肝湯加味方處理群 - control群 - 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方의 混合製劑群의 順序로 537-541-660-645가 나타나 茵陳淸肝湯加味方處理群은 normal群에 비해 거의 意味없는 結果를 보였으며, p53의 結果와 같이 오히려 control群과 混合製劑群에서 약간의 活性增加를 보였다(Fig. 11).

<RT-PCR의 結果>

bcl-2

A normal群 B 韓藥製劑群 C control群 D 10% ethanol +韓藥製劑群



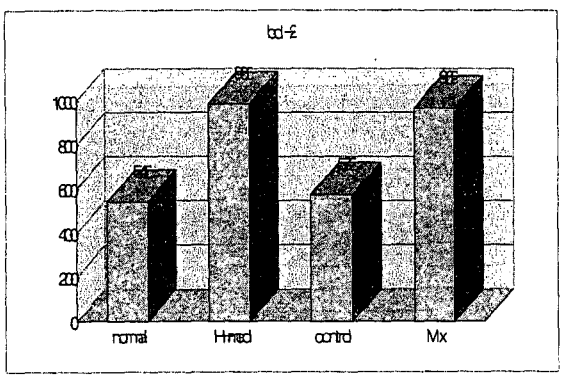
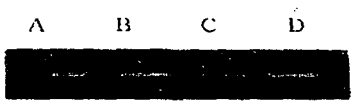


Fig. 8 The result of bcl-2 quantitative RT-PCR. Contrast of non-treated, Injinc-hunggantang-derivative, 10% ethanol treated and Mixed material agent

bcl-x_L

A normal群 B 韓藥製劑群 C control群 D 10% ethanol + 韓藥製劑群



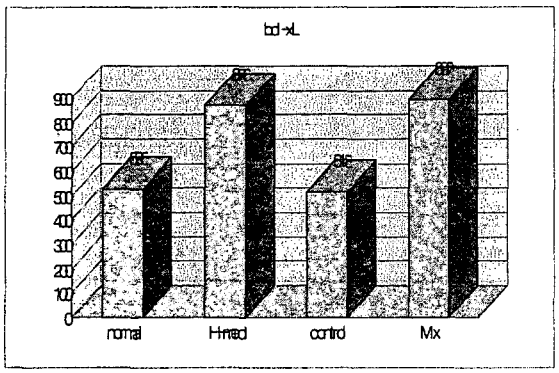
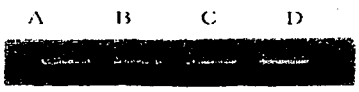


Fig. 9 The result of bcl-xL quantitative RT-PCR. Contrast of non-treated, Injinc-hunggantang-derivative, 10% ethanol treated and Mixed material agent

p53

A B C D

normal群 韓藥製劑群 control群 10% ethanol + 韓藥製劑群



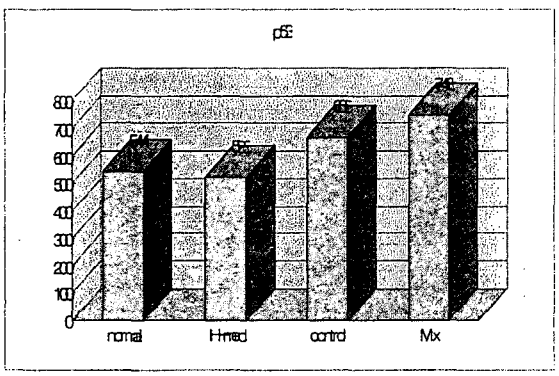
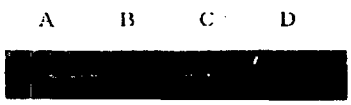


Fig. 10 The result of p53 quantitative RT-PCR. Contrast of non-treated, Injinc-hunggantang-derivative, 10% ethanol treated and Mixed material agent

waf1

A B C D

normal群 韓藥製劑群 control群 10% ethanol + 韓藥製劑群



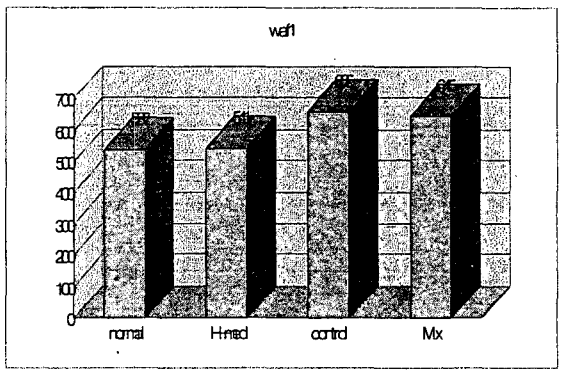


Fig. 11 The result of waf1 quantitative RT-PCR. Contrast of non-treated, Injinc-hunggantang-derivative, 10% ethanol treated and Mixed material agent

3. Western blotting

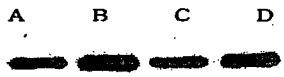
緩衝溶液을 製作하고 試料를 反應시킨 後 電氣泳動, blotting을 거쳐 結果를 確認하였다. 그 結果 茵陳淸肝湯加味方處理群 band의 두께는 bcl-x_L에서 가장 有意性있게 나타났으며, bcl-2에서도 有意性있는 두께를 보였다. 그러나 normal群, control群, 混合製劑處理群과 band의 두께가 큰 格差를 보이는 것은 bcl-x_L이고, bcl-2에서는 全體的으로 band가 두꺼웠다.

p53과 waf1의 경우 全體的으로 band의 두께가 一定해서 有意性을 나타내지 않았으며 waf1에서 normal群과 茵陳淸肝湯加味方處理群이 약간 진한 density를 보였으나 큰 意義는 없었다.

<Western blotting의 結果>

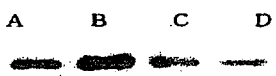
bcl-2

A	B	C	D
normal群	韓藥製劑群	control群	10% ethanol + 韓藥製劑群



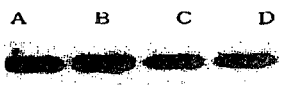
bcl-x_L

A	B	C	D
normal群	韓藥製劑群	control群	10% ethanol + 韓藥製劑群



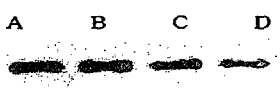
p53

A	B	C	D
normal群	韓藥製劑群	control群	10% ethanol + 韓藥製劑群



waf1

A	B	C	D
normal群	韓藥製劑群	control群	10% ethanol + 韓藥製劑群



V. 考 察

韓醫學에서 肝疾患에 대한 內容은 肝熱, 黃疸, 脇痛, 積聚, 鼓脹, 酒傷, 勞倦傷 등[1,2,24~26] 의 症候에 收錄되어 있다. 이 가운데 바이러스性 肝疾患과 關聯되는 內容은 黃疸[25,26], 鼓脹[21,24]의 症候에서 主로 찾아볼 수 있으며, 特히 黃疸은 바이러스性 肝炎의 가장 中心이 되는 症候이다. 黃疸에 대해 黃帝內經에서는 ≪素問·平人氣象論≫에서 "尿黃赤 安臥者 黃疸[3]"이라 하였고, ≪素問·刺熱篇≫에서 "肝熱病者, 小便先黃, 腹痛多臥, 身熱. 熱爭則狂言急驚, 脇滿痛, 手足躁, 不得安臥[3]"라 하였으며, ≪靈樞·論疾診尺篇≫에서는 "身痛而色微黃, 齒垢黃, 爪甲上黃, 黃疸也. 安臥小便黃赤, 脈小而澁者不嗜食[4]"이라 하여 黃疸의 定意와 理學的인 所見을 提示하였다. 이는 急·慢性肝炎이나 肝硬變證에서 흔히 나타날 수 있는 症狀이다. 傷寒論[24]과 金匱要略[25]에는 黃疸의 病理機轉, 治法, 治方 및 豫候에 關한 內容을 記述하였다. 즉 黃疸의 程度나 體液의 狀態에 따른 渴症 有無, 小便의 利不利에 따른 豫後 뿐 아니라 黃疸을 五疸로 分類하고 具體的인 治療藥物을 提示하고 있어 黃疸에 대한 觀察이 보다 細密하고 確實해짐을 알 수 있다. 以後로도 黃疸에 대한 記錄[21,22,26,30,31,34]이 많이 나타나며, 그 중 많은 部分이 慢性的인 肝臟疾患에 起因하는 症狀에 대한 觀察이었던 것임을 알 수 있다.

우리나라의 경우 特히 B型 肝炎바이러스에 依한 慢性肝疾患의 罹患率은 世界的으로 高頻度를 보이며[5], 95년 統計廳에서 發表한 死亡原因統計結果에서 볼 때 40代男子의 境遇 肝疾患으로 死亡하는 比率이 運輸事故나 新生物보다 더 높았고, 全體 人口 중 肝癌에 依한 死亡率은 世界 1位[7]를 記錄하고 있다. 이와 같이 肝疾患에 대한 對處가 時急한 環境的인 要求에도 不拘하고 效果的인 肝疾患對策은 現在로서는 未洽한 實定이다. 이에 많은 硏究者들이 肝疾患에 關聯한 硏究實跡

을 發表[8~13,15,16]하고 있는 데, 特히 韓藥과 肝의 關係는 最近 그 結果가 注目된다.

本 實驗에 使用된 茵陳淸肝湯은 2000餘年 前부터 黃疸의 治療에 使用되어 온 茵陳五苓散의 加味方이다. 茵陳五苓散은 張[24,25]이 黃疸의 治療에 使用한 以來 現在까지도 臨床에서 淸熱利濕을 目標로 慢性肝炎에 應用되고 있는 處方이다. 本 實驗에 쓰인 茵陳淸肝湯加味方은 張이 濕熱黃疸의 治療에 使用한 茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고 地楡 蘿蔔子 靑皮 砂仁을 加味하여 構成된 茵陳淸肝湯에 三稜 蓬朮 및 茜草根 烏犀角을 加하여 淸熱利濕 消積祛瘀를 目標로 臨床에서 慢性肝疾患 治療에 活用되고 있는 處方이다.

方中의 茵陳[6,27,29,32]은 味苦性平微寒하여 肝膽脾胃經으로 歸經하며 淸熱利濕, 退黃疸, 除脾胃濕熱鬱結, 發汗利水, 傷寒時疾狂熱의 治療에 사용된다. 地楡[6,22,23,32]는 味苦酸性微寒하고 肝大腸經으로 歸經하며 淸熱收斂 下焦血證濕熱을 治하고 吐血 衄血 大小便血症에 炒黑하여 使用한다. 茯苓[6,27,29]은 味甘性平하고 心肺脾胃腎經으로 歸經하며 生津止渴, 利水滲濕, 健脾益氣, 寧心安神의 效能이 있다. 猪苓[6,22,23]은 味甘淡性平하고 腎膀胱經에 歸經하고 利水滲濕, 淸熱, 開腠發汗 등의 效能이 있다. 白朮[6,22,23,27,29]은 味甘微苦性溫微香하며, 脾胃經에 歸經하고 補脾和中, 燥濕, 補氣補血, 利水止汗의 效能이 있다. 澤瀉[6,22,23,27]는 味甘性寒하고 腎膀胱經에 歸經하며 一切濕熱之病에 利水滲濕, 淸熱 등의 效能이 있다. 蘿蔔子[6,22,23,29]는 味甘辛性平하고 胃肺經으로 歸經하며 下氣散結, 寬中消食, 化痰散瘀의 效能이 있다. 靑皮[22,23,27]는 味苦辛性溫하며 肝膽經으로 歸經하고 疎肝破氣, 散積消痞의 效能이 있다. 三稜[6,22,27,29]은 味苦性平하고 肝經에 歸經하며, 破血中之氣, 散一切血瘀氣結, 消腫止痛의 效能이 있다. 蓬朮[23,27,29]은 味苦性溫辛하며 肝經에 歸經하여 主一切氣, 能通肝經聚血, 行氣消瘀, 通經化食止痛의 效能이 있다. 砂仁[6,22,29]은 味辛性溫하며 脾胃經에 歸經하여 和胃醒脾, 通行結滯, 化濕, 安胎의 效能이 있다. 甘草[6,23,27,29]는 味甘性平하며 肝脾經 및 其他 모든 經脈에 歸經하고 補脾胃, 瀉心火 散表寒, 協和諸藥, 通行十二經, 解百藥毒의 效能이 있다. 茜草根[6,22,23,32]은 味苦性寒無毒하며 肝經에 歸經하고 凉血止血, 祛瘀通經하여 吐血, 衄血, 崩漏下血, 外傷出血, 瘀阻經閉, 關節痺痛, 跌撲腫痛등에 效能이 있다. 烏犀角[27]은 味苦鹹性寒無毒하며 心, 肝, 胃經에 歸經하고 凉血止血, 瀉火解毒, 安神定驚의 功效로 傷寒溫疫熱入血分, 驚狂, 煩燥, 譫妄, 斑疹, 發黃, 吐血, 衄血, 下血, 癰疽瘡毒등에 効能이 있다.

韓醫學에서 肝炎에 대한 體系的인 硏究로 金등[8~10]은 肝臟에 대한 解剖學的인 槪念을 導入하여 肝臟病 自體에 대한 硏究에 關心을 가지기 始作하면서 黃疸의 原因에 대한 文獻考察을 通하여 肝炎治療의 方向을 設定하였다. 한편 禹[9]는 肝臟疾患에 茵陳을 增量하여 投與한 結果 茵陳의 血中濃度가 一定한 水準 以上 充分히 維持되어서 結果가 더 좋게 나타나는 것을 報告하였다. 金등[8]은 B型肝炎患者에게 生肝健脾湯이 效果的임을 밝혔고 以後 다시 3,136例의 慢性肝疾患 患者에게 投與하여 좋은 效果가 있음을 報告하였다. 또한 金[12]은 마우스 肝炎바이러스로 誘發한 電擊性肝炎에 대해 茵陳淸肝湯의 投與로 生存率이 20%에서 53%로 높아지고, 肝細胞內의 바이러스 增殖이 抑制되는 傾向이 있고, 肝細胞壞死 및 炎症細胞의 浸潤이 減少됨을 報告하였다. 禹[9]는 慢性 B型肝炎 患者에 대한 臨床硏究에서 茵陳淸肝湯을 投與하여 肝機能檢査上의 好轉率이 74%에 이르고, HBeAg이 追跡可能한 患者의 29%, 恢復된 患者의 63%에서 陰轉되었으며 아무런 臨床上의 副作用이 없음을 報告하였다. 또한 金[11]은 茵陳淸肝湯의 安全性에 關한 硏究에서 마우스에 最高用量으로 單回 投與, 28日 連續經口投與 등에서 異常所見이 發見되지 않아 臨床用量으로 經口投與時 急性·亞急性·慢性 經口毒性 및 어떠한 副作用도 나타나지 않아 安全性에 問題가 없는

것으로 報告하였다. 姜[13]은 茵陳淸肝湯加味方이 마우스 肝炎바이러스를 感染시킨 後 水浸스트레스로 誘發한 마우스의 肝硬變症에서 肝機能改善, 肝保護, 肝損傷恢復 및 再生에 有意한 效果가 있어 바이러스性 慢性肝炎이 肝硬變症으로 移行되는 것을 뚜렷하게 抑制하였다는 內容을 發表하였다. 이 後에도 肝疾患의 治療에 대한 硏究는 繼續 進行되어 왔다[15,16].

最近의 硏究傾向은 漸次 免疫學的인 槪念으로 疾病을 觀察하고 있으며 方法論的으로는 細胞單位의 代謝 및 apoptosis(細胞自然計劃死)에 關與하는 蛋白質, DNA, RNA의 活性에 따라 疾病의 發病原因과 轉變過程을 物質代謝의 相關關係로 判定할 수 있다는 假說[40,45,48]에서 出發하고 있다.

細胞의 成長 및 分化의 調節은 細胞가 正常的으로 자라는데 必要로 하는 機構로서, 이 過程에 어떤 原因으로든 간에 均衡이 깨어지게 되면 正常細胞에서 非正常的인 細胞로 되며 無節制한 細胞의 成長은 癌細胞로 發展하는 繼起가 되는 것이다. 細胞의 成長은 細胞週期(cell cycle)에 따라 이루어지며 細胞週期의 進行은 外部的 또는 內部的인 signal의 傳達을 이어받아 順次的으로 進行된다. 細胞成長過程에 거치는 cell cycle은 G1, S, G2, M phase를 거치는 동안에 段階別로 必要한 細胞내 物質들이 生産되어 關與하게 되고, 必要한 物質들의 生産은 signal 傳達 cascade를 거쳐 細胞質(cytoplasm) 또는 核內로부터 protein modifica- tion또는 gene expression過程을 거쳐 이루어 진다. 細胞成長에 必要로 하는 여러 細胞내 因子들 중에 cell cycle關聯因子, signal transduction 關聯因子들의 機能이 重要視되며 最近에 外國에서는 cell cycle因子들의 同定 및 分離가 可能해지면서 이들의 正常 細胞 成長過程에서의 役割에 대한 硏究가 活潑히 進行되고 있다.

細胞週期는 한 細胞가 成長하여 두 細胞로 分裂되는 過程에 모든細胞가 거치는 過程으로 한 細胞週期는 G1期, S期, G2期 및 M期로 便宜上 나누고 있다. G1期는 첫번째 休止期로서 細胞가 分裂된 直後 다음의 成長過程을 始作하기 以前에 必要한 細胞內 因子를 準備하고 適切한 크기의 細胞가 되도록 準備하는 期間으로써 이때 다음 過程인 S期로 가기위한 充分한 細胞內 因子들이 만들어 지지 않으면 다음 期로 가지 못하게 調節하는 첫번째 check point가 있다. 이 check point를 G1 check point라고 하며 이곳에서는 다음 細胞週期가 始作될 수 있는지 與否를 調査하며 萬若 細胞가 準備가 되어 있지 못하면 cell cycle의 進行을 遮斷하여 細胞가 G1期에서 arrest되도록 調節한다. 또한 이 G1 check point는 細胞가 成長過程으로 進行될 것인지 아니면 細胞分化過程으로 들어갈 것인지를 決定하는 重要한 始點이기도 하다. 이 G1 check point에서의 決定에 따라 細胞는 成長過程 또는 分化過程의 두 길을 달리 가게 된다. 一段 G1 check point에서 細胞가 成長過程으로 갈 수 있는 條件이 이루어졌다고 判斷되면 細胞는 S期로 넘어간다. S期에서는 核에 있는 遺傳情報를 가진 DNA의 複製(replication)가 이루어지는 時期로서 한 染色體에서 두 copy의 染色體가 되는 時期이다. 一段 S期에서 DNA가 複製되어 두 copy가 되면 다음에는 두 細胞로 分裂되기 爲해 核 以外에 細胞質 內의 여러 因子들이 複製되어야 한다. S期가 끝나면서 細胞는 第 2休止期인 G2期로 넘어가는데 이때 必要로 하는 細胞質疑因子들이 生産되면서 한 細胞가 두 細胞로 分裂되는데 必要한 因子들이 모두 만들어지는 時期이다. 萬若 이 時期에 細胞質의 모든 部分이 充分하게 生成되지 않으면 G2期에서 다음 細胞의 分裂이 實際로 일어나는 M期로 進行되지 못한다. G2期에서 M期로 넘어갈 수 있는지를 調査하는 point가 있으며 이를 G2 check point라 한다. 이 G2 check point에서는 G1 check point에서와 類似하게 實際로 細胞의 分裂이 일어날 수 있는지 與否를 檢討한다. 萬若 細

胞分裂이 일어날 準備가 안되어 있으면 細胞週期는 G2에서 멈추게 된다. 一段 G2에서 한 細胞가 두 細胞로 될 수 있는 모든 準備가 되어지면 細胞週期는 M期로 넘어간다. M期에서는 細胞質의 分裂(cytoki- nesis)이 일어나며 細胞壁이 생기면서 한 細胞가 두 細胞로 實際로 나뉘어지는 時期인 것이다[20].

이와같이 細胞의 分化 및 成長에 關與하는 因子는 그것이 作用하는 時期와 密接한 聯關을 지니며 現在 그 內容이 活潑히 硏究되어지고 있다[14,18,19].

本 實驗에서 使用한 MTT 檢査方法은 Cell의 viability를 測定하는 方法으로 1983年 Mosmann[50]에 依해 처음 試圖되었으며, 1986年 Cole[35]과 1988年 Alley등에 依해 使用되기 始作하여 最近 널리 普及되었다. MTT는 3-[4,5-Dimethylthiazol-2- yl]- 2,5-diphenyltetrazdium bromide ; Thiazolyl blue 이며, 100mg, 250mg, 500mg등 多樣한 用量의 yellow water-soluble tetrazolium 染色으로 細胞의 viability에 따라 MTT-fromazan의 量이 달라지며 이를 適切한 溶媒에 作用시킨 後 spectrophotometer로 읽어내어 細胞의 生存能力을 測定한다.

RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)은 傳統的으로 特定 遺傳子의 RNA分析에 使用된 Northern blot의 問題點을 克復하는 方法[18,38,54]이다. 旣存 Northern blot方法의 短點인 一個 遺傳子分析에 5~10μg의 RNA를 必要로 한다는 點과 同位元素의 使用이 必須的이라는 問題點을 解決한 方法으로 微量(1μg以下)의 RNA만으로도 特定 遺傳子의 分析이 可能하기 때문에 敏感度가 뛰어나며, 同位元素의 使用이 必要하지 않다는 點 때문에 最近 大部分의 分子生物學的 硏究에 使用되어지고 있다. 그러나 細胞 또는 組織속에 存在하는 核酸의 template가 100萬倍 以上으로 增幅된다는 事實로 因하여 定量分析은 PCR施行 後에 그 product의 電氣泳動上의 세기만으로 結果를 서로 比較할 수 없는 短點은 繼續的으로 가지고 있다. 最近에는 標準 RNA를 利用하여 한 試驗管에서 逆轉寫가 일어나게 한 後 그 cDNA를 次例로 稀釋하고 各各을 PCR로 增幅하여 映像密度計(densitometer)로서 定量化하는 方法등을 利用하여 mRNA 定量方法을 確立하여 短點을 補完하였다[17,38].

Western blot[14,19]은 gene level의 測定法인 PCR과 比較하여 實驗 過程 중에서 觀察하고자 하는 分野가 protein level인 境遇에 施行되는 方法으로 mRNA의 product인 protein의 量을 band의 두께로서 判定하는 技法이다. 定量的인 分析法이 아직 確立되지 않았고 PCR方法의 發展에 따라 gene level의 檢査에 副次的인 意味로 施行하기도 하나 protein檢出의 敏感度가 優秀하기 때문에 繼續的으로 使用되고 있다.

1979년 Lane과 Crawford[43]는 SV40 tumor virus에 依하여 形質轉換된 細胞에서 large T抗原과 結合하는 分子量 53 kD의 蛋白質(p53)을 發見하고, 이 蛋白質을 SV40에 依한 形質轉換代謝에 關與하는 細胞性 因子로 發表했다. 곧 이어서 human, mouse등의 p53遺傳子가 分離되었다. p53 蛋白質이 癌細胞에서 많이 存在하고 正常細胞에서는 거의 檢出되지 않는 水準으로 發顯되기 때문에 p53遺傳子의 高發顯이 細胞의 發癌過程에 關與할 것이라고 생각되었다. 또한 癌細胞에서 分離한 p53遺傳子를 *ras* 或은 *myc*등의 發癌遺傳子와 同時에 REF細胞에 transfection하면 transformation을 誘導한다는 事實[39,44,45,47]은 p53遺傳子를 發癌遺傳子로서 認識하게 되었다. 그러나 약 10年間에 걸친 發癌遺傳子로서의 p53遺傳子의 機能解釋은 1989년 전혀 豫想하지 못하였던 方向으로 轉換되었다. 1989年 美國 Princeton大學의 Arnorld Levine博士硏究팀과 이스라엘 와이즈만 硏究所의 Moshe Oren博士 硏究팀이 各各 wild type p53遺傳子의 分離에 成功하고 이를 正常 및 癌細胞에 導入한 結果 p53遺傳子는 正常細胞의

transforma- tion을 誘導하는 것이 아니라 오히려 細胞의 形質變換(transformation)을 抑制하며, 癌細胞의 tumo- rigenesity를 抑制한다는 事實이 밝혀졌다[42]. 이로써 p53遺傳子를 癌 抑制遺傳子로 다시 命名하고 전혀 새로운 方向으로 活潑한 硏究가 進行되고 있다. 앞서 細胞週期에 대한 說明에서 言及되었지만 G1期와 G2期에는 各各 細胞의 生長을 關與하는 重要한 瞬間인 check point가 있다. p53 遺傳子는 G1 phase의 check point에서 arrest를 일으켜 Apoptosis(細胞自然計劃死)에 關與한다고 알려졌다[43,48].

p21(waf1) 蛋白質은 waf1, cap20, cip1, sdi1 등으로도 알려져 있는데[20] 서로 다른 實驗室에서 다른 方向에서 接近하여 同定되었기 때문이다. p21은 老化된 細胞에서 그 量이 增加하므로 細胞分裂을 抑制하는 것으로 알려져 있다. p21遺傳子發顯은 p53이 p21의 promoter site에 結合하여 增加시키는 p53依存的 經路와 이와 無關한 p53非依存的 經路에 依해 調節됨이 最近 밝혀지고 있다[36,37,49,53]. 正常的인 細胞에서 p21은 4個의 複合體로 發見되는데 Cyclin, CDK, PCNA와 結合物을 이루고 있다. 또한 p53과 p21은 損傷된 DNA를 monitor하는 G1 check point에 必須的인 蛋白質이다. 正常 成人에서 p21이 많이 發顯되는 組織과 細胞들은 甲狀腺, 前立腺, 骨格筋, 腎臟, 乳房, 睾丸, 消化器官의 上皮細胞, 皮膚의 皮脂細胞 등이다[20].

Bcl-2[40,41,46,52,55]는 分子量 26kD의 protein으로서 chemoresistance에 重要한 役割을 擔當하여 여러 種類의 刺戟에 대해 apoptosis를 block하는 特異機能을 가지고 있다고 알려져 있다. 臨床的으로 bcl-2의 發顯은 non-Hodgkin's lymphoma, acute myelogenous leukemia, prostate cancer 및 neuro- blastoma에서 나타나며, 이의 發顯은 좋지않은 prognosis와 낮은 治療反應을 反影한다. bcl-2의 overexpression과 cytotoxic agent로 因한 cancer chemoresistant 形態는 tumor cell apoptosis의 program完成을 沮害한다.

Bcl-2 familiy(群)에 屬하는 關聯蛋白인 bcl-2, bcl-x, bax 등의 發顯은 cell이 apoptosis로 進行時 感受性을 決定한다[40]. 이러한 硏究가 進行되면서 硏究者들은 low bcl-2와 high bax level에서 cell의 spontaneous apoptosis가 일어나며, 反面에 non-apoptotic cell에서는 high bcl-2와 low bax level이 나타남을 發見하였다.

Bcl-2와 bax는 서로 相對的인 protein으로 大部分의 境遇 Heterodimer의 形態로 存在한다고 알려졌다. bcl-2의 境遇 어떤 種類의 細胞毒性으로 因하여 發生되는 cell death에 있어서 apoptosis를 抑制하는 機能을 가지고 있다. bcl-2의 活性化는 곧 cell death의 確率이 줄어들었음을 意味한다. bax는 이와 反對로 apoptosis를 誘發하여 cell death를 促進하는 機能이 있다[48]. 만일 bcl-2나 bax의 single form인 Homodimer가 늘어나게 되면 그 것이 apoptosis의 signal이 되는 것이다. 卽, single bax가 活性化되면 apoptosis를 促進하여 cell death가 늘어나고 single bcl-2가 活性化되면 apoptosis를 抑制하여 cell death가 줄어들게 되는 것이다.

Bcl-x[40,51]는 bcl-2 gene family의 새로운 一員으로 主로 neural tissue에 많이 分布한다. 사람에 있어서 bcl-x는 두가지 分野로 mRNA의 種이 區別되는데, bcl-x_L과 bcl-x_S이다. 이는 아마도 lymphoid cell에서의 apoptosis를 modulation하는 機能을 가진 것으로 생각된다.

蛋白質合成 중 longer transcript한 product로 여겨지는 bcl-x_L은 bcl-2와 類似하게 作用하는 點이 明確하여 그 機能上 IL-3 依存性 hemato-poietic cell line에서 apoptosis를 沮害한다. 이와 反對로 smaller transcript한 product로 여겨지는 bcl-x_S는 bcl-2에 依한 保護效果를 破棄함으로서 cell death의 誘發因子가 된다고 알려져 있다.

本 實驗에서 MTT assay는 實驗的 肝細胞를 各各 6時間, 12時間, 24時間, 36時間, 48時間, 60

時間, 72時間의 處理時間別로 normal群, 茵陳淸肝湯加味方을 10㎕/㎖, 50㎕/㎖, 100㎕/㎖의 3種으로 處理한 群, 10% ethanol으로 處理한 control群, 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方를 混合하여 10㎕/㎖, 50㎕/㎖, 100㎕/㎖의 3種으로 處理한 群으로 나누어 各各의 MTT酵素 活性을 測定한 것이다.

Normal群에 대한 control群의 MTT酵素活性의 比率은 6時間에서 71.8%, 12時間에서 75.3%, 24時間에서 83.8%, 36時間에서 73.9%, 48時間에서 77.8%, 60時間에서 64.7%, 72時間에서 62.3%으로 平均 72.8%를 나타내서 實驗的 肝細胞가 ethanol에 依해 顯著히 viability가 줄어듬을 確認하였다.

茵陳淸肝湯加味方을 3種으로 處理한 境遇는 10㎕/㎖ - 50㎕/㎖ - 100㎕/㎖의 順으로 各各 6時間에서 94.9% - 92.3% - 85.9%(平均 91.3%), 12時間에서 89.6% - 96.1% - 76.6%(平均 87.4%), 24時間에서 104.1% - 75.7% - 78.4%(平均 86.1%), 36時間에서 113.0% - 98.6% - 92.8%(平均 101.5%), 48時間에서 103.2% - 115.9% - 112.7%(平均 110.6%), 60時間에서 86.8% - 97.1% - 95.6%(平均 93.2%), 72時間에서 95.7% - 78.3% - 100%(平均 91.3%)가 나타났고 10㎕/㎖群의 平均은 98.2%, 50㎕/㎖群의 平均은 93.4%, 100㎕/㎖群의 平均은 91.7%로서 比較的 normal群과 茵陳淸肝湯加味方 處理群은 藥材處理 用量이나 時間에 대해 viability가 損傷되지 않고, 오히려 36時間群, 48時間群에서는 活性이 더욱 增强되는 現象을 보여 時間的인 意味는 없는 것으로 思料되며 相對的으로 高濃度에서 보다 低濃度에서의 活性이 높았다. 이는 cell에 細胞毒性을 나타냈기 때문으로 보이나 多樣한 濃度를 모두 觀察하지 못하였으므로 이번 實驗의 結果만으로 濃度別 活性을 規定할 수 없었다.

이에 대해 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群은 10㎕/㎖ - 50㎕/㎖ - 100㎕/㎖의 順으로 各各 6時間에서 82.1% - 78.2% - 82.1%(平均 80.8%), 12時間에서 88.3% - 87.0% - 76.6%(平均 84.0%), 24時間에서 82.4% - 79.7% - 85.1%(平均 82.4%), 36時間에서 95.7% - 91.3% - 82.6%(平均 89.9%), 48時間에서 100.0% - 92.1% - 87.3%(平均 93.1%), 60時間에서 85.3% - 85.3% - 76.5%(平均 82.4%), 72時間에서 79.7% - 78.3% - 76.8%(平均 78.3%)로 나타났고 10㎕/㎖群의 平均은 87.6%, 50㎕/㎖群의 平均은 84.5%, 100㎕/㎖群의 平均은 81.0%로서 茵陳淸肝湯加味方를 混合한 境遇 control群과 比較하여 볼 때 ethanol을 處理하지 않은 群보다는 弱하지만 顯著하게 細胞의 viability를 增强시켰으며 細胞毒性은 6時間經過時와 72時間經過時가 가장 强하게 나타나 時間의 進行에 따른 變化가 보이지 않으므로 藥物이 細胞에 作用하는 時間과는 特別한 關聯이 없는 것으로 思料되며 相對的으로 高濃度에서보다 低濃度에서의 活性이 높았으나 實驗的 價値는 적었다.

本 實驗에서 定量 RT-PCR檢査는 各各 normal群, 茵陳淸肝湯加味方處理群, control群, 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方의 混合處理群에 대해 bcl-2, bcl-x_L, p53 waf1의 發顯度를 測定하였다. 培地에서 電氣泳動한 後, 이를 densitometer를 利用해 定量化한 結果 bcl-2는 各各 normal群-茵陳淸肝湯加味方處理群-control群-茵陳淸肝湯加味方 混合處理群의 順序로 540-985-572-969, bcl-x_L는 各各 526-870-578-897, p53은 各各 544-525-665-748, waf1은 各各 537-541-660-645의 density를 보였다.

Bcl-2의 境遇 茵陳淸肝湯加味方處理群에서 182.4%로 105.9%의 control群에 비해 顯著히 活性度가 增加되어 cell death를 抑制하는 效能이 높음을 나타내었고, 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서도 179.4%의 活性度 增加를 나타내어 茵陳淸肝湯加味方處理群의 bcl-2活性 增加效能이 顯著함을 보여주었다. Control群의 境

遇 105.9%로 10% ethanol의 處理는 bcl-2의 活性의 增加 및 減少에 거의 影響을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Bcl-x_L의 境遇는 bcl-2와 類似한 活性을 나타내는 蛋白으로서 結果 亦是 bcl-x_L의 特性上 bcl-2와 함께 增加하면서 cell death를 抑制하여 apoptosis를 誘發하는 作用이 적어진다. 따라서 茵陳淸肝湯加味方處理群의 活性이 165.4%로 98.5%의 control群에 비해 顯著한 活性度 增加를 보였고 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서도 170.5%로 亦是 活性增加를 보여 茵陳淸肝湯加味方의 活性增加 效能이 有意性이 있음을 보여주었다. Control群의 境遇는 앞서 bcl-2와 같이 活性의 增加 및 減少에 거의 影響을 미치지 않는 것으로 나타났다.

P53의 境遇 茵陳淸肝湯加味方處理群의 活性이 96.5%로 茵陳淸肝湯加味方와의 聯關性은 거의 없는 것으로 나타났고 오히려 control群와 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서의 活性이 各各 122.2%와 137.5%로 높아져 ethanol의 細胞毒性으로 因해 p53의 活性이 顯著히 增加됨을 알 수 있게 하였다.

Waf1의 境遇는 活性化 過程의 特性上 p53에 의한 pathway에 影響을 받는 경우에 p53과 비슷한 樣相을 보이므로 茵陳淸肝湯加味方處理群의 活性이 100.7%로 茵陳淸肝湯加味方와의 聯關性은 거의 없으며 control群과 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서의 活性이 各各 122.9%와 120.1%로 ethanol의 細胞毒性으로 因해 waf1의 活性이 增加됨이 나타났다.

本 實驗에서 western blotting은 定量檢査가 아니므로 視覺的으로 나타난 band의 density를 보고 檢出되는 protein의 量을 짐작해야 하는 데[17,19,20], bcl-2의 境遇 normal群-茵陳淸肝湯加味方處理群-control群-茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서 茵陳淸肝湯加味方處理群의 band가 가장 두껍게 나타나 앞서 敍述된 RT-PCR의 結果와 類似하게 bcl-2의 活性이 두드러졌고, bcl-x_L의 境遇도 위에서 살펴본 RT-PCR의 結果와 같이 活性이 類似하게 나타났다. 그러나 其他 p53, waf1의 境遇는 크게 意味있는 現象이 없이 비슷한 두께의 band를 보였다. p53과 waf1의 境遇는 茵陳淸肝湯加味方의 處理와는 相關없이 一定한 두께를 나타냈고, RT-PCR과는 다르게 ethanol處理에도 큰 變化를 보이지 않는 特徵이 있었다.

Ⅵ. 結 論

茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響에 대한 本 實驗은 마우스의 肝細胞를 分離한 後 混合培地에서 培養하여 各 試料를 10㎕/㎖, 50㎕/㎖, 100㎕/㎖의 3가지 濃度와 6時間, 12時間, 24時間, 36時間, 48時間, 60時間, 72時間의 7가지 時間別로 觀察하였다. 肝細胞에 대한 藥物損傷의 誘發은 10% ethanol이 包含된 培地에서 6時間 刺戟한 後 正常 培地로 交換하여 18時間後에 測定하였다. 細胞의 增殖과 死亡에 이를때에 分泌되는 蛋白質과 DNA, RNA를 MTT 檢査法, 定量 RT-PCR, Western blotting의 方法으로 그 所見을 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MTT assay의 結果에서 茵陳淸肝湯加味方處理群은 control群에 比較하여 뚜렷한 活性度의 增加를 보였다. 또한 10% ethanol과 茵陳淸肝湯加味方의 混合製劑群에서도 control群에 比較하여 높은 活性度를 보여 細胞保護作用을 나타내었다. 時間別과 濃度別 觀察에서는 特別한 有意性이 없었다.

2. 定量 RT-PCR檢査의 結果에서

i) Bcl-2의 境遇 茵陳淸肝湯加味方處理群과 混合處理群에서 顯著한 活性度 增加를 나타냈다. Control群은 活性의 增加 및 減少에 影響을 미치

지 않았다.

ii) Bcl-x_L의 境遇 茵陳淸肝湯加味方處理群은 bcl-2에서와 같이 顯著한 活性度 增加를 보였고 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서도 顯著한 活性 增加를 보였다.

iii) P53의 境遇 茵陳淸肝湯加味方處理群에서 活性의 增加 및 減少에 거의 影響을 미치지 않았다. Control群과 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서의 活性은 높아져 ethanol의 細胞毒性으로 因해 p53의 活性이 增加됨을 알 수 있었다.

iv) Waf1의 境遇 茵陳淸肝湯加味方處理群에서 活性의 增加 및 減少에 거의 影響을 미치지 않았다. Control群과 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群에서의 活性은 높아져 ethanol의 細胞毒性으로 因해 waf1의 活性이 增加됨을 알 수 있었다.

3. Western blotting의 結果 bcl-2와 bcl-x_L에서의 band가 가장 두꺼웠으며, 특히 bcl-x_L은 茵陳淸肝湯加味方處理群에서 normal群 및 茵陳淸肝湯加味方 混合處理群과의 差異가 뚜렷하였다. 그러나 p53, waf1의 境遇는 特別한 意味없는 비슷한 두께의 band를 보였다.

以上의 實驗結果에서 茵陳淸肝湯加味方은 MTT assay의 結果로 cell의 viability를 높게 維持시키는 效能이 認定되었고, 定量 RT-PCR의 結果로 bcl-2와 bcl-x_L의 活性이 높아져 細胞의 死亡率이 낮아져서 藥物에 依한 cell death를 抑制하는 效能이 認定되었으며, western blotting의 結果로 gene level의 效能 뿐만 아니라 protein level에서의 活性이 높아 細胞의 死亡率이 낮아짐이 確認되었다. 따라서 茵陳淸肝湯加味方은 肝細胞에 대한 毒性을 막고 外部刺戟에 依한 細胞死亡을 抑制하여 肝機能을 保護하는 機能이 認定되므로 臨床에서 各種 肝疾患에 多樣하게 使用할 수 있을 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 全國 韓醫科大學 肝系內科學敎授 共著 : 肝系內科學, 서울, 東洋醫學硏究院, pp.33,230~232, 1992.
2. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.512~516, 1989.
3. 洪元植 : 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學硏究院, p.66, 1985.
4. 洪元植 : 精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學硏究院, p.178,249,309, 1985.
5. 醫學敎育硏修院 : 家庭醫學, 서울, 서울大學校出版部, p.216, 1995.
6. 全國 韓醫科大學 本草學敎授 : 本草學, 서울, 永林社, p.56,58,149,281,284, 285,358,378,393,455, 456,513, 1991.
7. 統計廳 : 95年度 死亡原因統計結果, 서울, 1996.
8. 金秉雲 : 慢性肝炎 3,136例에 대한 臨床分析과 生肝健脾湯의 治療效果, 서울, 大韓韓醫師協會, 大韓韓醫學會誌, 14(1): p.216, 1993.
9. 禹弘楨 : 慢性B型肝炎에 대한 茵陳淸肝湯의 效果, 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 - 肝臟編-, 大韓韓醫師協會, pp.18~53, 1995.
10. 李長勳 : 肝疾患治療劑의 效能에 關한 實驗的 硏究, 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 - 肝臟編-, 大韓韓醫師協會, pp.123~163, 1995.
11. 金榮哲 : 茵陳淸肝湯의 安全性에 關한 硏究, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1996.
12. 金珍珠 : 茵陳淸肝湯이 MHV-2로 誘發된 마우스의 損傷肝에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1996.
13. 姜京兌 : 茵陳淸肝湯加味方이 實驗的 흰쥐의 肝硬變症에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1997.
14. 맹영희 : Molecular genetic characterization of the pathway of p53 Tumor suppressor

gene in human stomach cancer, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1996.
15. 김주현, 김연수, 서동진 : 韓國人 肝細胞癌患者에서 HBsAg 및 Anti- HCV의 發顯狀, 서울, 大韓內科學會誌, 第46卷 2號, 181~191, 1994.
16. 이관식 : B型 바이러스性 慢性 活動性 肝炎 患者에서 스테로이드 離脫療法 및 알파 인터페론 投與에 依한 免疫狀態의 變化, 서울, 延世醫大 學位論文集, 242~243, 1993.
17. 정현채, 김정목, 송인성, 김정룡 : 人體 大腸上皮細胞 및 大腸粘膜에 發顯된 여러 Cytokine 遺傳子의 定量分析을 通한 人體 宿主 防禦機轉에 關한 硏究-合成 RNA를 利用한 定量的 逆轉寫 PCR法의 應用, 서울, 大韓內科學會誌, 第49卷 1號, pp.1~13, 1995.
18. 이준성, 송동화, 박찬욱, 이문성, 조성원, 심찬섭, 진소영 : 重合酵素 連鎖反應法을 利用한 Helicobacter pylori의 檢出, 서울, 大韓內科學會誌, 第 49卷 3號, pp.347~359, 1995.
19. 김대곤, 임수일, 안득수 : Hep G2 肝癌細胞柱에서 Retinoic Acid가 p53 蛋白, Ki-67 및 PCNA/Cyclin發顯에 미치는 效果, 全州, 大韓內科學會誌, 第49卷 2號, pp.210~220, 1995.
20. Experimental and Molecular Medicine, 서울, 大韓 生化學·分子生物學會, Vol.3/ No.1, pp.16~26, Vol.3/ No.6, pp.11~15, 1996.
21. 巢元方 : 諸病源候論(上), 北京, 人民衛生出版社, pp.385~404, 1983.
22. 楊東喜 : 本草備要解釋, 臺北, 國興出版社, p.32,160,167,169,212,222,303, 334,418, 中華69年.
23. 新文豊出版公司編 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文豊出版社, pp.58,544,566~571,734,1169,1288, 1593,1596,1602,1606,2456,2524,2525,2562, 1985.
24. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 大星文化社, p.225, 240,249,250,408,411, 1984.
25. 張仲景 : 金匱要略, 서울, 杏林書院, pp.392~394, 1984.
26. 朱震亨 : 丹溪治法心要, 山東科學技術出版社, p.89, 1985.
27. 神農 : 神農本草經, 文光圖書有限公司, 臺北, p.41,43,55,81,94,170,175, 中華69年.
28. 王浴生 等 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.38~49,264~277, 320~323,326~330, 718~723,736~741,757~770,1066~1070, 1983.
29. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 高文社, p.400,446, 549,781,925,1188,1224,1229, 1983.
30. 李梴 : 原本編註醫學入門 外集卷二, 서울, 大星出版社, p.284,285, 1981.
31. 張伯臾 : 中醫內科學, 北京, 人民衛生出版社, pp.391~393, 1988.
32. 陳存仁 : 漢方醫藥大辭典, 서울, 東都文化社, p.64,74,80,204,244,256, 1984.
33. 黃宮繡 : 本草求眞, 臺北, 宏業書局, p.7,15,37, 109,144,147,151,153,228,236, 1990.
34. 孫思邈 : 備急千金要方, 臺北, 自由出版社, p. 194,195, 1980.
35. Cole SP : Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, Cancer chemother Pharmacology, 17 (3), pp.259~263, 1986.
36. Datto, M. B. et al : Transforming growth factor induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mec- hanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: pp.5545~5549, 1995.
37. El-Deiry, W. S et al : WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell, 75: pp.817~825, 1993.
38. Ferre, Francois : Quantitative or semi-quantitative PCR : reality versus myth. PCR Methods and Applications 2: pp.1~9,

1992.

39. Ginsberg, D. et al : Wild-type p53 can down- modulate the activity of various promoters, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: pp.9979~9983, 1991.
40. Harry W. Findley et al : Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xL, Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, Atlanta GA, Blood; Vol.89, pp.2986~2993, 1997.
41. Hitoshi Ikeda et al : Bcl-2 Oncoprotein Expression and apoptosis in neuroblastoma, Gunma Japan, Journal of Pediatric surgery; Vol.30, pp.805~808, 1995.
42. Kern, S. E. et al : Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression, Science (Washington DC); 256: pp.827~830, 1992.
43. Lane DP, Crawford LV : T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells, Nature, 15; 278(5701): pp.261~263, 1979.
44. Levine A. J et al : The p53 tumor suppressor gene and product, Cancer Surveys, 12: pp.59~79, 1992.
45. Lin, D. et al : Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1mediated G1 arrest. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: pp.10079~10083, 1994.
46. M. Lisovsky et al : Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells : Regulation of Bcl-2 and Bax, Houston TX, Blood ; Vol.88, pp.3987~3997, 1996.
47. Manuel Serrano et al : Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, New York, Cells ; Vol.88, pp.593~502, 1997.
48. Marcel Leist et al : Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins, Germany, Gastroenterology; 112: pp.923~934, 1997.
49. Michieli, P. et al : Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. Cancer Res., 54: pp.3391~3395, 1994.
50. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of immunologic methods, 16, 65(1-2), pp.55~63, 1983.
51. Mukund G. Dole et al : Bcl-xL is Expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis, Cleveland Ohio, Cancer research; 55, pp.2576~2582, 1995.
52. Naoto Itoh et al : Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death, Osaka Japan, The journal of immunology, Vol.151, pp.621~627,
53. Rakesh Datta et al : Activation of a CrmA-insensitive, p53-sensitive pathway in ionizing radiation-induced apoptosis, Boston, The journal of biological chemistry; Vol.272 No.3, pp.1965~1969, 1997.
54. Wang, A. M. et al : Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: pp.9717~9721, 1989.
55. Yiping Tu et al : Upregulated Expression of Bcl-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to Doxorubicin, Etoposide, and Hydrogen peroxide, LA CA, Blood ; Vol.88, pp.1805~1812, 1996. 1993.