

自抜“清肝湯”이 HepG2 cell의 염증반응에 대한 연구

홍상훈 · 최병태¹ · 이용태^{2*}

동의대학교 한의과대학 간계내과학교실 · 동의대학교 한의과대학 한의학연구소,
1: 동의대학교 한의과대학 해부학교실 · 동의대학교 한의과대학 한의학연구소,
2: 동의대학교 한의과대학 생리학교실 · 동의대학교 한의과대학 한의학연구소

Effect of Zibachunggan-tang on lipopolysaccharide-induced expression of NF-κB downstream genes in HepG2 cell

Sang Hoon Hong, Byung Tae Choi¹, Yong Tae Lee^{2*}

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Donggeui University,
1: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine Donggeui University,
2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine Donggeui University

To determine the effect of Zibachunggan-tang(ZCT) on the process of lipopolysaccharide (LPS)-induced nuclear factor-κBp65 (NF-κBp65) activation, and LPS-induced expression of pro-inflammatory proteins including tumor necrosis factor-α (TNF-α), nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), in HepG2 cell. Immunoblot analysis showed that the level of nucleic NF-κBp65 was rapidly up-regulated and cytosolic inhibitory I-κBα was down-regulated by LPS challenge. While ZCT inhibited an increase of NF-κBp65 and degradation of I-κBα in HepG2 cell. Beside LPS-induced expression of a group of genes, such as TNF-α, inducible iNOS and COX-2, are repressed by ZCT. It may be concluded that ZCT attenuates the progress of LPS-induced inflammation by reduction of NF-κBp65 activation. The ZCT would be useful as a therapeutic agent for endotoxin-induced liver disease.

Key words : Zibachunggan-tang(ZCT), LPS, NF-κBp65, cyclooxygenase-2 (COX-2), HepG2 cell

서론

간질환에 의한 사망은 인구 10만 명당 22.3명으로 10년 전에 비해 9.9명의 감소하였으나 여전히 우리나라의 사망률에 차지하는 부분이 높고, 이는 OECD 국가 중에서도 헝가리, 멕시코 다음으로 높은 수준을 보이고 있다. 특히 사회적인 활동이 많은 40대의 경우 악성신생물과 더불어 간질환은 주요사망 원인이며, 악성신생물 중에서도 간암은 폐암, 위암 등과 중요한 사망원인이다¹⁾. 우리나라는 B형 간염 바이러스에만 관련된 감염 예방 및 치료 비용이 연간 1조 70억원 이상이다²⁾. 이것은 국내에 간질환이 광범위하게 퍼져있으며 그에 따른 사회적 비용이 많음을 말해준다. 한의계에서도 <黃帝內經> 이래로 다양한 치료방법들이 발전시켜 臨床에서 활용되어 왔으며, 최근에는 현대적인 방법을 이용하

여 기존 한의학 처방을 검증하고 새로운 치료제의 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

현재의 국내연구를 살펴보면, 김은茵陳清肝湯으로 전격성 간염을 일으킨 마우스의 생존율을 53%로 높이는 효과가 있다고 보고하였고³⁾, 박 등은茵陳清肝湯加味方이 Bcl-2, Bcl-XL 활성을 높여 세포사멸을 억제한다고 보고하였으며⁴⁾, 홍 등은茵陳清肝湯加味方이 간세포를 보호하고 Cpp32 protease, Fas를 억제하고, Bcl-2를 활성화시켜 세포사멸을 억제한다고 보고하였다⁵⁾. 임상 연구로는 우는茵陳清肝湯이 만성B형간염 환자의 혈청학적 검사상 AST, ALT 등의 간기능개선과 HBeAg의 陰轉에 대한 효과가 있다고 보고하였고⁶⁾. 손 등은加味清肝湯으로 간세포 보호 효과 및 면역조절효과를 보고하였으며⁷⁾, 조 등은加味清肝湯으로 57명의慢性肝疾患患者를 대상으로 임상 시험한 결과 50%의 환자에서 AST, ALT의 저하가 나타났고, HBeAg 소실률은 42.9%였다고 하였고⁸⁾. 이 등은清肝解酒湯으로 알코올성 지방간 환자의 임상증상 개선 및 AST, ALT, GGT, TG 수치의 하강을 보고하였다⁹⁾.

* 교신저자 : 이용태, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : ytleee@donggeui.ac.kr · Tel : 051-850-8635
· 접수 : 2003/08/02 · 수정 : 2003/09/05 · 채택 : 2003/10/08

이에 저자는 서양 의학적으로도 그 치료법이 미흡한 바이러스성 간 질환자 및 기타의 간질환자에게 응용될 수 있는 한약 제재의 개발을 위하여 경상북도 지역에서 채취 가능한 약제로서 자발청간탕(ZCT)을 구성하고, 간암세포주인 HepG2 세포에 LPS에 의한 염증 반응을 일으켜서 ZCT의 항염증 효과를 실험적으로 검증하고자 인간 간암세포주인 HepG2 세포에 LPS에 의한 염증 반응을 유발시켜, NF-κBp65의 nuclear translocation 억제 효과, inhibitory subunit인 I-κBα degradation 억제 효과 및 NF-κB downstream gene products의 생성에 대한 효과를 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 약재는 한약 규격집에 근거하여 경상북도 영천, 청송, 의성, 영양, 봉화에서 채취한 것을 사용하였으며, 처방 1첩의 구성내용과 분량은 다음과 같다(Table 1)

Table 1. Prescription of ZCT

韓藥名	Herbal Name	Scientific name	Dose
茵陳	Artemisiae capillaris Herba	<i>Artemisia capollaris Thunb</i>	20g
白朮	Attractylodes macrocephalae Rhizoma	<i>Attractylodes macrocephala Koidz</i>	8g
白茯苓	Poria	<i>Poria cocos Wolf</i>	8g
山查	Crataegii fructus	<i>Crataegus pinnatifida Bunge</i>	8g
白芍藥	Paeoniae radix Alba	<i>Paeonia lactiflora Pall</i>	6g
葛根	Puerariae Radix	<i>Puerarialobata(willd.)Ohwi</i>	6g
當歸	Angelicae gigantis radix	<i>Angelica gigas Nakai</i>	6g
柴胡	Flos puerariae	<i>Puerarialobata(willd.)Ohwi</i>	6g
Total			64g

2. 시약의 구입과 준비

LPS (from *Escherichia coli* Serotype 055:B5)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였으며, 10 mg/ml의 농도로 deionized distilled water (DDW)에 녹인다음 1회 사용량 만큼 분주하여 냉동 보관하였다. Western blotting에 사용한 anti-NFκBp65, anti-IκBα, anti-TNF-α, anti-COX-2, anti-iNOS는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하여 0.2~0.5 μg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. 이 밖의 모든 시약은 Sigma-Aldrich 에서 구입하였다.

3. ZCT 수용액 제조

ZCT에 들어간 한약재 1첩을 1,000 ml의 물에 넣어 1시간 동안 끓여 수용액을 추출한 다음, 185 mm filter paper (ADVANTEC TOYO No. 2, Japan)를 사용하여 두 번 여과하고, 여과액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 동결 건조시켰다. 건조된 시료를 곱게 마쇄하여 -20 °C에 보관하였으며, 실험에 사용하기 직전 10 mg/ml의 농도로 세포 성장 배지에 녹여 0.2 μm의 syringe filter로 다시 여과하여 500 μg/ml의 농도로 처리하였다.

4. 세포주의 배양 및 처리

인간 간암세포주인 HepG2 세포와 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다. HepG2 세포는 Minimum essential medium (MEM, GIBCO BRL, Grand Island, NY)에 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), 1% penicillin-streptomycin (GIBCO BRL)을 첨가한 성장배지를 사용하였다. 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GIBCO BRL)에 10% FBS를 첨가한 성장 배지로 배양하였다. 두 세포주 모두 5%의 CO₂ 농도가 유지되는 humidity incubator에서 37 °C의 온도로 배양하였다. SDS-PAGE 및 Western blotting을 위해 HepG2 세포에 trypsin-EDTA (GIBCO BRL)를 처리하여 culture plate로부터 detach시킨 다음, 100 mm의 culture plate에 seeding하고 48 hr 동안 안정화시켰다. 500 μg/ml의 농도로 동결건조한 약재를 처리하고 2시간 후, 10 μg/ml의 LPS를 처리하고 1, 6 시간 후, 배양세포를 harvest하였다.

5. Nuclear extract와 cytosolic extract의 분리

배양세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻은 후, buffer A(10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF)로 15 min 동안 ice 상에서 incubation하고 final concentration이 0.5%가 되도록 NP-40을 처리하고 강하게 vortexing하였다. 30 sec 동안 5,000 rpm에서 원심분리하여 상층액은 cytosolic extract로 취하고, pellet은 buffer B (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)에 녹여 15 min 동안 ice상에서 incubation하고, 13,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리하여 상층액을 nuclear extract로 취하였다.

6. SDS-PAGE 및 Western blotting

배양세포를 PBS로 씻은 후, lysis buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% SDS, 0.5% Triton X-100, 1 μM PMSF, 50 mM NaF, 50 mM Tris pH 7.4)로 lysis시켜 14,000 rpm에서 20 min 간 원심 분리하여 whole cell protein extract를 얻었다. whole extract 및 nuclear extract, cytosolic extract를 Biorad의 protein assay kit (Hercules, CA)를 이용하여 protein을 정량한 후, 동량의 Laemmli's sample buffer를 가하여 100 °C에서 3분간 가열한 다음, 10% SDS gel에 loading하여 전기영동하였다. 전기영동 후 gel상의 protein을 nitrocellulose membrane으로 transfer하여 5% skim milk로 비특이적인 항원의 반응을 blocking하고, anti-NFκBp65, anti-IκBα, anti-TNF-α, anti-COX-2, anti-iNOS와 이에 대한 secondary antibody (HRP-conjugated goat anti-rabbit)를 처리하였다. PIERCE의 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Rockford, IL)를 membrane에 가하여 X-ray film에 감광시켰다.

7. Immunofluorescence staining

RAW264.7 세포를 cell scraper로 긁어모은 다음, coverslip 위에 seeding하고 24 시간 동안 안정화시켰다. 500 μg/ml의 동

결건조한 약재를 처리하고, 2시간 후 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 처리하였다. 1 hr 후 배지를 제거하고 PBS에 3.7% 농도로 희석시킨 formaldehyde로 30 min 간 4°C에서 고정하였다. 0.2% Triton X-100으로 permeabilization하고, 2% bovine serum albumin (BSA)로 비특이적인 항원의 결합을 억제시킨 후, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 anti-NF- κ Bp65 항체를 처리하여 4 시간 동안 항원-항체반응을 일으킨 다음, PBS-T (0.05% Tween-20 in PBS)로 씻어내고, FITC-conjugated goat anti-rabbit (SIGMA-ALDRICH) 항체를 4 °C 암상태에서 1 hr 동안 처리하였다. PBS-T로 씻어낸 후, 세포핵의 위치를 판별하기 위한 염색으로 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)를 2 min 간 처리하여 DDW에 씻어낸 다음 Crystal mount (Biomed, Foster, CA)로 slideglass에 mounting하였다. NF- κ Bp65의 세포내 localization은 488 nm의 excitation wave length를 내는 UV filter로 관찰하였으며, 동일한 field에 위치하는 세포핵은 359 nm의 xcitation wave length를 내는 UV filter로 관찰하였다. 관찰과 사진촬영은 Axioskop 2 plus fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany)와 AxioCam digital camera (Carl Zeiss), AxioVision software (Carl Zeiss)를 이용하였다.

결 과

1. ZCT의 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation 억제 효과
 HepG2 세포에서 LPS에 의한 염증 반응을 알아보기 위해 LPS 처리 2시간 전에 ZCT를 전처리하고, LPS를 처리한 다음, 1, 6 시간 후 세포를 harvest하여 10% SDS-PAGE로 전기영동하였다. Whole cell extract를 전기영동한 gel을 Coomassie blue staining을 실시한 것이며, 그 결과 total protein band의 차이점을 보이지 않았다. 그러나 NF- κ Bp65의 세포내 localization에서는 차이가 남을 알 수 있었다(Fig. 1. B, C). Nuclear extract의 NF- κ Bp65는 정상상태에서는 잘 보이지 않으나 LPS를 처리하면 band가 진하게 나타났고, 이러한 현상은 Gagamchunggan-tang의 전처리에 의해 부분적으로 억제되고 있음을 보여준다(Fig. 1. B). LPS 처리에 의해 cytosolic NF- κ Bp65는 감소되지만, ZCT의 전처리에 의해 cytosolic NF- κ Bp65가 억제되는 것으로 보인다(Fig. 1. C). 아울러 이런 현상을 확인을 위하여 anti-NF- κ Bp65 항체를 이용한 immunofluorescence staining을 실시하였다. RAW264.7 마우스 대식세포에 동일한 조건에서 실험한 후 anti-NF- κ Bp65 항체와 FITC-conjugated goat anti-rabbit 항체를 차례로 처리하고 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 정상상태의 세포와 ZCT를 각각 처리한 세포에서는 세포핵이 아닌 세포질에 NF- κ Bp65가 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 2. A, B). 그러나 LPS를 처리한 경우 세포핵이 위치한 곳에 집중적으로 NF- κ Bp65가 위치하고 있음을 알 수 있다 (Fig. 2. C). Fig. 1. B, C와 마찬가지로 이러한 현상은 ZCT를 전처리한 세포에서는 억제되고 있음을 보여주고 있다(Fig. 2. D).
 이상을 종합하면, ZCT는 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation에 대해 억제효과가 있는 것으로 생각된다.

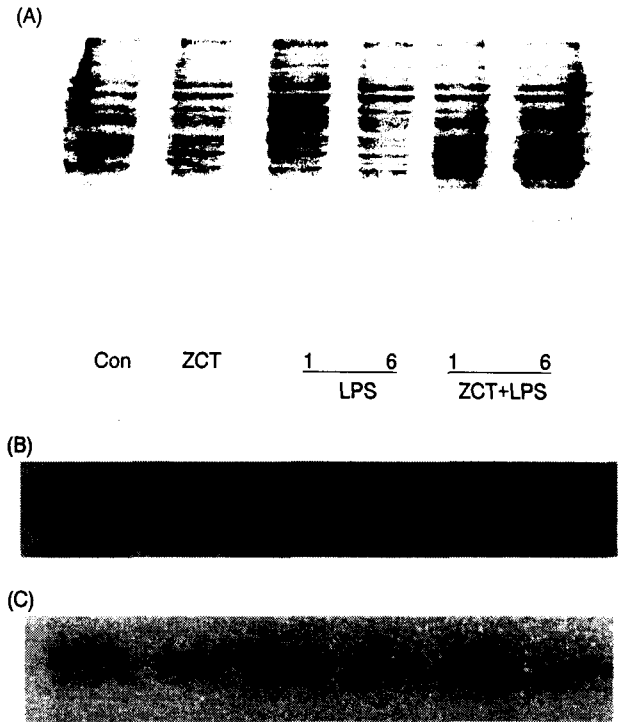


Fig. 1. Inhibitory effects of ZCT on the nuclear translocation of NF- κ Bp65 (A), Coomassie blue staining with HepG2 cell whole extract-subjected 10% polyacrylamide gel. (B:nuclear NF- κ Bp65) and C:cytosolic NF- κ Bp65), inhibition of LPS-induced NF- κ Bp65 nuclear translocation by ZCT. Cells were pretreated with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ZCT before LPS challenge (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. 40 μg of cytosolic and nuclear extract were examined by Western blotting with anti-NF- κ Bp65 antibody.

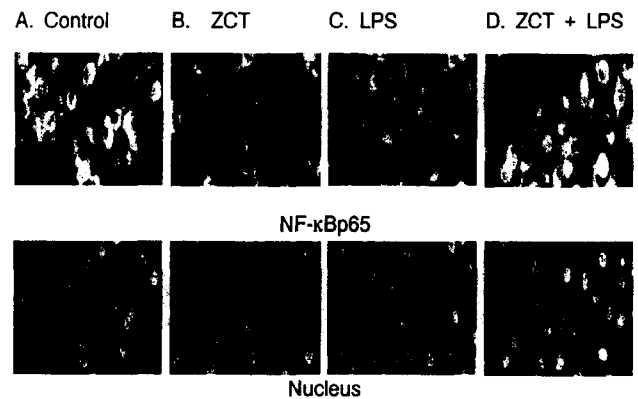


Fig. 2. Effects of ZCT on localization of NF- κ Bp65 in RAW264.7 cells (A), Normal. (B) ZCT alone. (C), LPS alone. (D), treatments of ZCT before LPS challenge. Cells were pretreated with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ZCT before LPS challenge (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. Fixed cells were stained with anti-NF- κ Bp65 rabbit polyclonal antibody and FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody.

2. ZCT의 LPS에 의한 I- κ Ba degradation 억제 효과

ZCT는 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation을 억제하는 것으로 나타나므로 이에 중요한 요인으로 작용하는 I- κ Ba의 protein level을 조사하였다. 그 결과 정상상태에서는 많은 양의 I- κ Ba가 cytosol에서 관찰되었으나, LPS가 처리되면 그 양이 상당히 줄어드는 것으로 나타났다. 그러나 이 또한 ZCT의 전처리에 의해 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과들을 바탕으로 LPS에 의해 유발되는 염증반응에서 중요한 역할을 수행하는 NF- κ Bp65의 활성화가 ZCT에 의해 억제될 수 있음을 알 수 있었다.

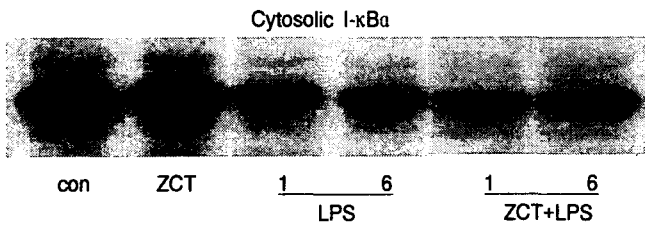
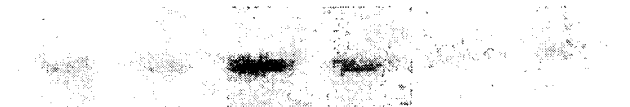


Fig. 3. Inhibition of I-κBa degradation by ZCT HepG2 cells were pretreated with 500 μg/ml of ZCT before LPS challenge (10 μg/ml), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. 40 μg of cytosolic extract were examined by Western blotting with anti-I-κBa antibody.

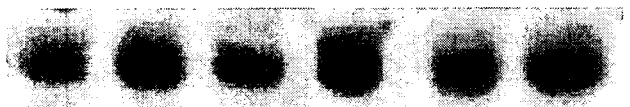
3. NF-κB downstream gene products의 생성에 대한 ZCT 효과

ZCT의 작용기전을 확인하기 위해 NF-κB downstream gene products의 level을 Western blotting으로 조사하였다. 그에 따라 염증기전의 신호전달 및 면역작용에서 기능을 수행하는 NO를 합성하는 효소인 iNOS의 level을 먼저 조사하였다. 정상 상태에서는 잘 보이지 않는 iNOS가 LPS를 처리하면 발현이 일어나며, 이러한 결과는 ZCT의 전처리에 의해 억제되어진다. 또한 이차적인 염증반응을 일으키는 TNF-α 및 COX-2 도 ZCT의 전처리에 의해 억제되고 있다(Fig. 4).

iNOS



TNF-α



COX-2



Fig. 4. Inhibitory effect of ZCT on LPS-induced iNOS, TNF-α and COX-2 expression HepG2 cells were pretreated with 500 μg/ml of ZCT before LPS challenge (10 μg/ml), and then exposed to LPS for 1 and 6 hours. 40 μg of whole extract were examined by Western blotting with anti-iNOS antibody, anti-TNF-α antibody and anti-COX-2 antibody.

고찰

肝疾患 치료제에 대한 최근에 한의학계의 연구들은 淸肝湯을 중심으로 이루어지고 있다. 연구에 사용된 치료 처방을 살펴보면, 새로운 간질환의 치료제를 찾는 노력의 결과 많은 종류의 항바이러스제, 면역조절제가 임상에서 활용되고 있으나 간기능의 정상화, 간경변, 간암으로의 진행 방지 및 바이러스에 대한 면역획득의 궁극적인 조건을 만족시키는 약제는 아직까지 개발되지 않고 있다¹⁰⁾. 새로운 간질환 치료제 개발을 위한 연구에 사

용된 처방 내용을 살펴보면, 이 등은 인진, 갈근, 적양, 진피, 백출, 택사, 백복령, 후박, 사인, 초두구, 감초로 淸肝解酒湯을 구성하여 알콜성 지방간환자의 임상증상 개선 및 AST, ALT, GGT, TG의 수치의 하강을 보고하였다⁹⁾. 손 등은 인진, 별갑, 나복자, 백출, 백복령, 저령, 사인, 감초로 가미청간탕을 구성하여 혈청 지질의 강하 효과를 보고 하였다¹¹⁾. 조 등은 별갑, 우각, 인진, 택사, 백출, 산사육, 맥아, 백복령, 후박, 곽향, 저령, 목향, 사인, 청피, 지실, 생강, 감초로 가미청간탕을 구성하여 만성간질환자의 간기능 개선 및 HBeAg 음전율이 42.9%임을 보고하였다⁸⁾. 박 등은 갈근, 인진이 ADH, ALDH 활성 억제 효과, 혈중 AST, ALT의 효과를보고하였고¹²⁾, 감 등은 인진, 지유(초흑), 백출, 저령, 백복령, 복분자, 택사, 나복자, 청피, 삼릉, 봉출, 사인, 감초, 생강 으로 茵陳淸肝湯加味方을 구성하여 collagen type IV의 발현 및 간조직의 섬유화를 억제하는 효과를 보고하였고¹³⁾, 김 등은 인진, 지유, 백출, 백복령, 저령, 복분자, 택사, 나복자, 청피, 감초로 茵陳淸肝湯을 구성하여 C형 간염바이러스의 감염에 대한 억제작용과 면역계 사이토카인 조절을 통한 간세포보호작용이 있음을 보고하였다¹⁴⁾. 이에 저자는 실험상 간질환 치료 효과가 있을 것으로 추론되는 약물중에 우리나라에서 채취 가능한 인진, 백출, 복령, 산사, 작약, 갈근, 당귀, 시호로 청간탕을 구성하여 우선 항염증 효과를 검증하고자 하였다.

茵陳은 滲瀉利水, 淸濕熱作用이 있어 黃疸 등 濕熱熏蒸型 간질환에 다용되고 있다. CCL4로 유발된 간장해를 보호 활성¹⁵⁾, 에탄올에 의해 증가되는 TNF-α와 IL-1α의 생성을 억제시킴으로써, 에탄올 의한 간세포의 독성작용을 억제¹⁶⁾, Fas-FasL 상호작용을 매개로 한 apoptosis로 인한 간기능장애, 급성 간염, 만성 간염 등의 질환에서 간기능을 보호하는 활성¹⁷⁾, 간세포의 TGF-β 1 합성을억제 및 섬유화 유발 유전자의 발현을 억제¹⁸⁾하는 효과가 있다. 白朮은 간변성 과사정도를 감소시키며, AST, ALT를 낮추며 손상된 간조직의 회복을 촉진시키는 효과가 있다¹⁹⁾. 白茯苓은 면역작용을 조절하여 항종양효과 및 임파세포를 자극하여 인터페론 생성을 촉진하였다²⁰⁾. 山查는 관상동맥의 혈류량을 증가시키고, 혈중 지질을 강하시키며 담즙분비를 촉진하고 간장 보호 효과가 있다²¹⁾. 葛根은 김 등이 葛根이 알코올로 인해 손상된 간세포를 회복시키는데 효과가 있음을 보고하였고²²⁾, 박 등은 갈근이 ADH의 활성저해작용으로 알코올의 대사과정에서 acetaldehyde 합성을 현저하게 억제하였으며, 감소된 glucose의 상승효과, 증가된 triglyceride, BUN, AST, ALT level을 정상적으로 감소되었다¹²⁾. 白芍藥은 형태학상의 간세포변성과 과사를 개선시키고 회복시키며 간세포재생효과가 있다¹⁹⁾. 當歸는 補血和血하고 간독성 물질로부터의 간세포 손상을 보호하는 작용²³⁾, 음주 후 혈중에 남아있는 알코올 및 알데히드를 효과적으로 제거하는 효과가 있다²⁴⁾. 柴胡는 간손상의 회복 및 실험적 膽汁鬱滯의 개선²⁵⁾, 항종양효과²⁶⁾가 있다. 따라서 ZCT는 바이러스성, 알코올성, 영양대사성 간질환 환자에서 지질대사의 개선, 혈청 AST, ALT의 저하, 간세포 보호 및 재생 효과가 있을 것으로 추론하고 실험에 임하였다. 세포가 염증 유발 물질에 노출되면 세포막 연접에 관여하는 단백질과 cyclooxygenases, lipoxigenases

등과 같은 arachidonic acid 대사과정의 중요 효소, 그리고 염증성 사이토카인과 그 수용체, MHC (major histocompatibility complex) 및 metalloproteases 등을 암호화하고 있는 유전자들이 활성화되고 그에 따라 NF- κ B가 활성화된다^{27,28}. 정상적인 환경에서 NF- κ B는 모든 유핵세포의 세포질에서 p50/p65 subunits의 heterodimer로 존재하고 있으며, inhibitory subunit 인 I- κ B와 결합하고 있다. 염증성 자극이 주어지면 수분 내에 I- κ B 인산화효소 (IKK)의 활성화가 유도되고, 활성화된 IKK는 I- κ B의 인산화를 일으켜 세포내 단백질 분해기전의 하나인 ubiquitin-mediated protein degradation을 유발한다. I- κ B로부터 자유로워진 NF- κ B는 세포핵 속으로 이동하고, NF- κ B 결합영역이 있는 염증 유전자의 프로모터에 결합하여 그 유전자의 전사를 일으킨다. NF- κ B에 의해 활성화되는 대표적인 염증 유전자는 iNOS, COX-2, TNF- α 등이며, 이들은 이차적인 염증반응을 세포내에서 일으키는 것으로 알려져 있다^{29,30}. ZCT의 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation 억제 효과를 살펴보면, Fig. 1, 2에서 나타난 결과들은 LPS에 의한 NF- κ B로부터 I- κ Ba 분리현상이 ZCT에 의해 억제되는 것으로 추측할 수 있다. 또한 이러한 분리에 중요한 역할을 수행하는 IKK의 활성화 역시 억제될 것으로 추측할 수 있으나 본 실험에서는 IKK activity assay를 통한 직접적인 확인은 하지 않았다. 그러나 Fig.3의 결과를 보면 ZCT가 I- κ Ba의 degradation pathway인 ubiquitin-mediated protease pathway에 관여함을 알 수 있는 간접적인 결과이나 이 또한 직접적인 검증이 필요하다. ZCT는 I- κ Ba, NF- κ Bp65의 활성화를 억제하여 염증반응의 진행과정을 차단함을 알 수 있다. iNOS는 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS) 등과 더불어 nitric oxide synthase (NOS) family의 한 종류이며, 두 가지 다른 종류의 NOS와는 달리 염증성 자극이 주어질 때 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. NOS는 L-arginine, O₂, NADPH-derived electron으로부터 L-citrulline, NADP, 그리고 nitric oxide의 합성을 증가하게 된다³¹. COX-2는 아라키돈산 대사 작용에서 중요한 역할을 수행하는 효소로서 역시 염증성 자극 등에 의해 유도된다. 아라키돈산은 세포내 원시발암 유전자로 알려진 Ras 단백질의 불활성화에 관계하는 Ras GTPase-activating protein을 억제하며, 혈소판에 의해 NO의 합성이 촉진되도록 하는 기능을 가지는 물질이다^{32,33}. COX에 의해 생성되는 prostaglandin은 많은 유도체를 가지고 있으며, 그 중 COX-2에 의해 생성되는 prostaglandin E2는 세포의 성장과 분열에 중요한 역할을 수행하는 mitogen-activated protein kinase cascade를 억제하는 것으로 알려져 있다³⁴. TNF- α 는 암세포를 사멸 시키는 프로그램인 apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 대표적인 물질로 세포내 단백질 분해기구의 또 다른 축인 caspases cascade를 활성화시켜 apoptosis를 유도한다³⁵. 그러나 최근 TNF- α 가 세포 증식 및 생존에 관여하는 신호전달경로의 활성화에도 관여하는 것으로 알려져 있다³⁶. ZCT의 전처리로 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 활성화가 억제되므로 그 downstream gene products인 TNF- α , COX-2 및 iNOS의 발현이 완전히 또는 부분적으로 억제됨은 당연할 수도 있다. 그러나 이들 gene의 프로모터 영역에는 NF- κ B binding

site만 존재하는 것이 아니라 여러 가지 다른 전사인자들도 결합할 수 있으므로³⁷⁻³⁹ Fig. 4의 결과들은 여러 가지 의미를 가지고 있다. iNOS gene의 promoter 영역에는 interleukin 등에 의해 활성화되는 전사인자인 signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) 또는 STAT3 역시 결합할 수 있으며, STAT을 활성화시키는 경로는 염증반응의 또 다른 주요한 경로로 인식되어지고 있다⁴⁰. 그러므로 Fig. 4의 결과로 추측할 수 있는 것은 ZCT가 LPS의 downstream signaling 중 NF- κ B 및 STAT의 활성화 경로를 차단하여 iNOS의 발현이 억제될 수도 있음을 시사한다. 또한 TNF- α 와 COX-2의 경우에도 iNOS의 발현과 비슷한 효과를 나타내므로 Fig. 4의 결과는 ZCT의 항염증 효과를 확인하고 있다.

이상을 종합하면, ZCT는 LPS에 의해 활성화되는 대표적인 염증전사인자로 보아 NF- κ Bp의 활성화를 억제시켰으며, 이는 NF- κ B의 억제 단백질인 I- κ B의 분해를 저해함으로써 일어난 것이다. 또한 downstream gene products인 TNF- α , COX-2 및 iNOS의 발현을 억제하므로 ZCT는 간암세포주에 대한 탁월한 항염증효과를 가지고 있음을 제시하고 있다.

결론

ZCT가 인체 간암세포주인 HepG2 세포에 박테리아에서 추출한 염증 유발물질인 LPS를 처리하여 유발시킨 일련의 염증반응에 미치는 영향을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

ZCT는 LPS에 의한 NF- κ Bp65의 nuclear translocation에 대해 억제효과를 가지고 있다. ZCT는 LPS에 의해 유발되는 염증반응에서 중요한 역할을 수행하는 NF- κ B의 활성화를 억제시킨다. ZCT는 NF- κ B downstream gene products인 iNOS, COX-2, TNF- α 등의 발현을 억제시킨다.

ZCT는 LPS에 의해 활성화되는 대표적인 염증전사인자로 보아 NF- κ Bp의 활성화를 억제, downstream gene products인 TNF- α , COX-2 및 iNOS의 발현을 억제하므로 ZCT는 간암세포주에 대한 탁월한 항염증효과를 가지고 있음을 알 수 있었고 이를 근거로 임상적인 연구가 지속되어야 한다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 동의대학교의 일반연구과제 (과제번호 : 2002AA056)에 의해서 수행됨

참고문헌

1. 통계청. 2001년도 사망원인통계연보. 1-21, 2002.
2. 양봉민, 백승운, 한오석, 이덕희, 최문석. B형 肝炎 바이러스 關聯 疾患의 社會的 費用 推計. 보건경제연구 6(2):117-142, 2000.
3. 김진주. 茵陳清肝湯이 MHV-2로 유발된 마우스의 損傷肝에 미치는 영향. 慶熙大學校 大學院. 1996.
4. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 간세포

- 의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지 19(1):145-164, 1998.
5. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 간세포활성세포 주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會紙, 19(2):337-372, 1998.
 6. 우홍정. 만성B형간염에 대한 茵陳清肝湯의 효과. 제2회 한·중 학술대회참가논문집-간장병-, 18-53, 1995.
 7. 손창규, 한성수, 조종관. 加味清肝湯의 肝保護 및 免疫調節效果. 대한한의학회지, 23(2):28-38, 2002.
 8. 조정효, 이용연, 서상훈, 유화승, 최우진, 이연월, 손창규, 조종관. 慢性 肝疾患 57例에 대한 臨床報告. 대한한의학회지, 21(4):112-121, 2000.
 9. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 청간해주탕이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지, 22(4):107-113, 2001.
 10. 이영석. 만성 B형간염의 치료. 대한간학회지 7권 부록1, 15-23, 2001.
 11. Son CG, Choi WJ, Shin JW, Han SH, Cho JH, Song KC, Cho CK. Effects of Gamichunggantang on hyperlipidemia. *Acta Pharmacologica Sinica*, 133-139, 2003.
 12. 박형규, 이장훈, 우홍정. 주상에 활용되는 수종의 한약물이 알코올대사 및 간장해에 미치는 영향. 대한한의학회지, 21(3):186-198, 2000.
 13. 강경태, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 간조직의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한의학회지 23(2):39-56, 2002.
 14. 김선민, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 C형 간염바이러스의 입과구계 세포감염에 미치는 영향. 22(1):53-62, 2001.
 15. 이체중, 김형환, 김종대, 김철호. 茵陳蒿의 열수 및 메탄올, 에테르, 부탄올 추출물이 CCl4 유발에 의한 간독성 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지, 21(1):100-107, 2000.
 16. 최수덕, 심정섭, 김일환, 김강산, 강병기. 茵陳蒿가 Hep G2 세포에서 에탄올 매개성 Cytokine 분비에 미치는 영향. 대한한방내과학회지, 21(1):87-93, 2001.
 17. 김선강, 김형환, 안중환, 김종대, 김철호. 茵陳蒿가 Fas-FasL 매개형 간세포 Apoptosis 에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 23(3):353-360, 2001.
 18. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한의학회지, 22(3):141-155, 2001.
 19. 方文賢, 宋崇順, 周立孝. 醫用中藥藥理學. 북경, 인민위생출판, p361,578,598,682. 1998.
 20. 鄭虎占, 董釋宏, 余靖. 中藥現代研究與應用. 北京, 學苑出版社, p2795,3126. 1998.
 21. 손창우, 채종구, 김길현, 신흥목. 山査의 혈관이완 효능과 항산화 작용. 동의생리병리학회지, 16(1):67-71, 2002.
 22. 김영철, 우홍정, 김병운. 加味對金飮子の 효능에 대한 실험적 연구. 경희한의대논문집, 16:7-29, 1993.
 23. 黃偉, 宋純清. 當歸의化學和藥理學研究進展, 중국중약잡지, 26(3):147-151, 2001.
 24. 정우상, 송재철, 박정미, 김상우. 당귀추출물 전처치가 Rat의 혈중 알코올 및 알데히드 농도에 미치는 영향. 대한한방내과학회지, 23(2):174-180, 2002.
 25. 김승모, 윤주현, 박재현. 柴胡가 총담관결찰 및 taurocholate 부하 흰쥐 간의 COMT 활성화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 21(2):275-281, 2000.
 26. 손갑호. 시호 인진의 간암세포에 대한 항암활성 및 함암제와의 병용 투여 효과. 대전대학교대학원, 1995.
 27. Sano H. [A new mechanism of COX-2 in inflammation. *Ryumachi*, 42(3):560-72, 2002.
 28. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci*, 1;7:d1899-914, 2002.
 29. Baldwin, AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-681, 1996
 30. Rothwarf DM, Karin M. The NF-kB activation pathway: A paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *SciSTKE*. 5: RE1, 1999.
 31. Nathan CF, Xie F. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269: 13725-13728, 1994.
 32. Sermon B.A., Eccleston J.F., Skinner R.H. and Lowe P.N. Mechanism of inhibition by arachidonic acid of the catalytic activity of Ras GTPase-activating proteins. *J Biol Chem*, 19;271(3):1566-72, 1996
 33. Signorello M. G., Pascale R. and Leoncini G.. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. *Eur J Clin Invest*, Apr;32(4):279-84, 2002.
 34. Kang SS, Li T, Xu D, Reinach PS, Lu L. Inhibitory effect of PGE2 on EGF-induced MAP kinase activity and rabbit corneal epithelial proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Jul;41(8):2164-9, 2000.
 35. Menon R, Lombardi S.J and Fortunato S.J. TNF-α promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet*, 19(4):201-4, 2002.
 36. Gupta S. A. decision between life and death during TNF-α-induced aling. *J Clin Immuno*, 22(4):185-94, 2002.
 37. Udalova IA, Kwiatkowski D. Interaction of AP-1 with a cluster of NF-kappa B binding elements in the human TNF promoter region. *Biochem Biophys Res Commun*, Nov 23;289(1):25-33, 2001.
 38. Punzalan C., Cai C., Schroeder RA. and Kuo PC. Redox regulation of the rat hepatocyte iNOS promoter. *Surgery*, Aug;126(2):450-5, 1999.
 39. Glinghammar B, Inoue H, Rafter JJ. Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1. *Carcinogenesis*, May;23(5):839-45, 2002.
 40. Darnell, JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science*, 277: 1630-1635, 1997.