

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α 신호전달계에 미치는 影響

강우성, 김영철, 이장훈, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The effect of *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*) on TNF- α signal transmission system in HepG2 cell

Woo-Sung Kang, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

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

Objectives : The main purpose of this study is to evaluate the effect of *Injinchunggan-tang* on TNF- α signal transmission system.

Materials and Methods : We analyzed the following with quantitative RT-PCR method; the effect of *Injinchunggan-tang* on secretion of TNF- α mRNA/protein and stability, the effect on gene revelation that consists of signal transmission system (TRAIL, NIK, A20, TRADD, RAIDD, RIP, TNFR-I, TNFR-II, TRAF1, TRAF2, FADD), the one on activation of p38, Erk1/2 MAPK and the rate of nuclear NF- κ B/cytosolic NF- κ B in HepG2 cell.

We also analyzed the inhibitory effect of *Injinchunggan-tang* on the apoptosis of HepG2 cell that TNF- α induces and the NF- κ B restraint effected by transfection of κ B Δ N through tryphan blue exclusion assay.

Results : *Injinchunggan-tang* prohibits revelation of TNF- α mRNA in HepG2 cell and the creation of protein. However, it has no effect on the stability of TNF- α mRNA. While it did not have any effect on the generation of TRAIL, NIK, A20, TRADD, RAIDD and RIP genes, *Injinchunggan-tang* reduces the revelation of TNFR-I, TNFR-II, TRAF1, TRAF2 and FADD genes.

It has been confirmed that *Injinchunggan-tang* restrains the revelation of TNF- α mRNA that is promoted by ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide, in proportion to the treatment density and time. It activated NF- κ B of HepG2 cell and promoted activation of NF- κ B that is occurred by TNF- α . It has been observed that the restraint effect against the TNF- α inducing apoptosis is lost when it is intercepted the function of NF- κ B in HepG2 cell.

Conclusion : It has been confirmed that *Injinchunggan-tang* has restraining effect against the revelation of TNF- α and mRNA that is constituent element of TNF- α signal transmission system. It also has been revealed that it restrains the activation of p38, Erk1/2 by TNF- α . Through this prohibiting effect, it is inferred that it restrains signal transmission among various cells that are related to inflammation reaction.

Meanwhile, *Injinchunggan-tang* protects liver cell from apoptosis that is caused by TNF- α , by maintaining the activating function for NF- κ B.

Key Words: *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*), TNF- α , HepG2 cell

1. 緒 論

우리나라는 바이러스성 간염의 이환율이 높고, 특히 B형간염 보균자는 전 국민의 5~7%에 이르고 있으며 C형간염도 점점 증가하고 있는 추세이다^{1,2}. 바이러스성 간염은 만성화되고 간경변증이나 간암으로 진행하는데 이러한 각종 간질환은 우리나라 40-50대 남성 사망률을 높이는 주요 원인이 되고 있다³.

· 접수 : 2004년 1월 24일 · 채택 : 2004년 3월 10일
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118 Fax. 02-958-9120 E-mail :
hjwoo@khu.ac.kr)

茵陳清肝湯은 清熱利濕시키는 茵陳四苓散⁴에 수종의 한약재를 가미한 처방으로 임상에서 바이러스성 간질환의 치료에 사용되고 있다. 茵陳清肝湯에 대한 研究로는, 急性·亞急性·慢性 經口毒性 실험에서 약물의 안정성에 어떠한 부작용도 나타나지 않았고⁵, 慢性B型肝炎 患者의 생화학적 간기능 검사와 HBeAg의 陰轉에 效果가 있었으며⁶, 電擊性肝炎을 일으킨 마우스의 生存率을 53%로 높이고⁷ 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 있다⁸고 報告하였다. 근래에는 분자생물학적인 연구를 통해 茵陳清肝湯 및 茵陳四苓散 분획물의 유전자 조절로 細胞死滅을 억제하며, 간세포를 활성화 시키고, Fas-mediated apoptosis를 억제하는 效果가 있음이 보고되었다⁹⁻¹¹.

본 연구에서는 茵陳清肝湯이 apoptosis에 있어서 death receptor와 관련된 HepG2 cell의 TNF- α 신호전달계에 미치는 영향을 분석하고자 HepG2 cell의 TNF- α 단백질 및 유전자 발현과 TNF- α 신호전달계 구성 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하고, ethanol 과 acetaldehyde 및 lipopolysaccharide에

의해 유도되는 TNF- α mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 신호전달체계에 있어 중요한 효소인 MAPK활성화와 NF- κ B활성화에 미치는 영향을 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹²에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 아래 표와 같다.

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료 (171g)을 3차증류수 (2000ml)로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 먼으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 35.6g의 건조추출물을 얻었으며 20.82%의 수율을 보였다.

Prescription of *Injinchunggan-tang*

構成藥物	생약명	용량
茵陳	Artemisiae Capillaris Herba	50g
地榆	Sanguisorbae Radix	15g
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	12g
豬苓	Polyporus	12g
茯苓	Hoelen	12g
覆盆子	Rubi Fructus	12g
澤瀉	Alismatis Rhizoma	8g
蘿蔔子	Raphani Semen	8g
青皮	Aurantii Immatri Pericarpium	6g
三稜	Scirpi Tuber	6g
蓬朮	Zeloariae Rhizoma	6g
砂仁	Amomi Semen	6g
甘草	Glycyrrhizae Radix	6g
生薑	Zingiberis Rhizoma	12g
Total amount		171g

2. 방법

1) HepG2 cell에 대한 검액의 처리

茵陳清肝湯이 TNF- α 신호전달계를 구성하는 유전자들의 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1×10^5 /well의 밀도로 배양한 후茵陳清肝湯을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리, 또한 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 12, 24, 48, 72 시간동안 처리하였다.茵陳清肝湯을 처리한 HepG2 cell과 처리하지 않은 cell(대조군)은 0.1% trypsin으로 회수하였으며 유전자 발현을 분석하기 위하여 protein 및 RNA를 추출하였다.

2) Quantitative RT-PCR

(1) RNA의 추출

RT-PCR 분석을 위한 RNA는 Solution D를 이용하여 추출하였으며 RNA는 아래와 같은 방법으로 추출하였다.

① Solution D의 제작

250g의 guanidine isothiocyanate을 293ml의 3차 증류수에 넣은 후 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 첨가하여 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다. 이와 같이 제작된 GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 첨가함으로써 solution D를 제작하였다.

② 세포배양으로부터 회수된 세포에 solution D 500 μl , 2M sodium acetate(pH4.0) 50 μl 를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500 μl , chloroform :

isoamyl alcohol (24:1) 100 μl 를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

③ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000 μl 를 넣어 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 침전시켰다.

④ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 除去한 후 RNA pellete을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30 μl 의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

(2) cDNA의 제작

① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

Reverse transcriptase buffer	2 μl
Random hexamer (10 pM)	1 μl
AMV-RT (10U/ μl)	1 μl
dNTP (10 pM)	1 μl
RNase inhibitor	0.5 μl
RNA	1 μg

② 혼합용액이 20 μl 가 되도록 sterile water를 첨가한 후 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 방치하였다.

③ 각 시료에 80 μl 의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

(3) Primer의 제작

사용된 oligonucleotide primers와 그 서열은 다음과 같다.

Oligonucleotide primer sequences used for quantitative RT-PCR analysis
(All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Primer	Nucleotide sequences
GAPDH	S	(Sense 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3')
	AS	(Antisense 5'-GACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3')
TNF- α	S	(Sense 5'-GATCCAGCGACTGCATCGAGATCCTC-3')
	AS	(Antisense 5'-TGCGCTAGTTGACAATCGAATGCCGCT-3')
TNFR-I	S	(Sense 5'-GATCCTACACTTGCAGGATGGATCAT-3')
	AS	(Antisense 5'-AACTGGGATCCGTCGATCCGTCCACCT-3')
TNFR-II	S	(Sense 5'-TTAGCTAGCCAGTCGATCCAATCCGAA-3')
	AS	(Antisense 5'-TGACGACAGACTTTCACAACCTGGGAT-3')

Gene	Primer		Nucleotide sequences
TRAIL	S	(Sense	5'-AGACATGAGACACATGACCGCTGTCA-3')
	AS	(Antisense	5'-ACGACAGCGCTTTAGCTAGCCGCGAC-3')
TRAF1	S	(Sense	5'-GCGCTGAAAATTTACATGACCCATGCT-3')
	AS	(Antisense	5'-AATGATCCAGTGAGTCCGGGTATATCG-3')
TRAF2	S	(Sense	5'-TTTCAGATGAGCTGGGACCCTAGCTTC-3')
	AS	(Antisense	5'-AACTCCCATCGGACTGATCCGACTCAA-3')
NIK	S	(Sense	5'-AATCCTGATTTTCGTAACCTAAGCTTCC-3')
	AS	(Antisense	5'-GGGCTCGATCCCTTTACATACTGGCA-3')
A20	S	(Sense	5'-TTGACTACGACACGATCTAACTCAACGC-3')
	AS	(Antisense	5'-ACATTCAGCGAGCTCGGGACTTACATAA-3')
FADD	S	(Sense	5'-TTGACGACGGGACAACTACTTGGCCCA-3')
	AS	(Antisense	5'-AACGCGCTACGAGAGCTAGTTTCGACT-3')
TRADD	S	(Sense	5'-GGTACGCTATCTAGAATCTAAATATTG-3')
	AS	(Antisense	5'-CCTAGACTTACGAGACTTAGACCAATC-3')
RAIDD	S	(Sense	5'-AATAATCCGACCTAAATGGCAGCTCCG-3')
	AS	(Antisense	5'-CGGCTATACCTAATGCGCGATCGIATT-3')
RIP	S	(Sense	5'-ACATCAGATCGGCTACGCGTACGAGAT-3')
	AS	(Antisense	5'-CCTGGCGTAGTACGATTGCAGTTTCAA-3')

(4) Quantitative PCR analysis

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10x amplification buffer	10 μ l
Mixture of dNTP (10 pM)	5 μ l
Primer 1 (10 pM)	2 μ l
Primer 2 (10 pM)	2 μ l
Template cDNA	4 μ l
H ₂ O	77 μ l

② mRNA-specific primer를 이용하여 아래의 조건으로 34-40 cycle의 PCR 반응을 시행하였다.

a. First cycle

Denaturation	5 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	1 min at 72°C

b. Subsequent cycles (32-38 cycles)

Denaturation	1 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	1 min at 72°C

c. Last cycle

Denaturation	1 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	10 min at 72°C

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

3) ELISA를 이용한 TNF- α 발현분석

TNF- α 단백질의 발현분석을 위해 세포배양액으로 분리된 TNF- α 의 양을 human ELISA system (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 정량하였다. 즉 50 μ l의 배양액과 biotin-conjugated TNF- α 를 혼합한 후 약 2시간 실온에 방치하였으며 horseradish peroxidase-conjugated streptavidin과 TMB substrate를 혼합한 후 450 nm에서의 OD값을 microplate reader를 이용하여 분석하였다.

4) TNF- α mRNA의 stability 분석

검액의 처리가 HepG2 cell의 TNF- α mRNA의 stability에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 actinomycin $10 \mu\text{g/ml}$ 의 전처리 후 검액을 투여하였다. 그 후 quantitative RT-PCR을 수행하여 결과를 TNF- α /GAPDH 비율로 나타내었다.

5) TNF- α mRNA 발현 유도 후 검액의 효과 분석

HepG2 cell에茵陳清肝湯을 6시간 동안 전처리 한 후 TNF- α 의 과잉 발현을 유도하는 것으로 알려진 ethanol, acetaldehyde 및 lipopolysaccharide(LPS)를 농도별로 24시간 동안 처리하고 생성된 mRNA의 양을 TNF- α /GAPDH 비율로 나타내었다.

6) TNF- α 에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는 영향 분석

TNF- α 에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는茵陳清肝湯의 영향을 조사하기 위하여 trypan blue exclusion assay를 시행하였다. 우선 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 TNF- α 의 영향을 파악하기 위하여 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 6-well plate에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지하에서 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 TNF- α 를 5, 10, 20 ng/ml의 농도로 처리하였다.茵陳清肝湯의 처리는 TNF- α 투여 2, 6, 12 시간 전에 시행하였으며 apoptosis의 변화유무를 대조군과 비교분석하였다.

7) NF- κ B 활성화 분석을 위한 세포질과 핵질 분리

배양세포는 ice-cold phosphate-buffered saline으로 2회 세척한 후 rubber policeman을 이용하여 회수하였다. 회수된 세포를 $6,000 \times \text{g}$ 로 약 1분간 원심하였으며 $100 \mu\text{l}$ 의 low salt buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM NaVO₄, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 0.2% Nonidet P-40, 10% glycerol, supplemented with a set of proteinase inhibitors, CompleteTM)를 이용하여 resuspension 하였다. Cell pellet을 얼음 위에 약 10분간 방치시킨 후 $13,000 \times \text{g}$ 로 2분간 원심분리하여 supernatants

(cytosolic extracts)를 취하였으며 즉시 dry ice/ethanol bath에 보관하였다. Pelleted nuclei는 $60 \mu\text{l}$ 의 high salt buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 420 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.1 mM NaVO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% glycerol, supplemented with CompleteTM)로 resuspension 한 후 protein 추출을 위해 약 30분간 shaking하였다. 이를 $13,000 \times \text{g}$ 로 10분간 원심분리 한 후 supernatants를 취하였다. 분리된 핵질과 세포질의 순도는 U1 SnRNP 70 과 beta-tubulin에 대한 immunoblotting을 통하여 각각 검증하였다.

8) Immunoblotting Assay

Lysis buffer[20 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium phosphate, 1 mM beta-glycerolphosphate, 1 mM NaVO₄, 1 mM PMSF]를 이용하여 세포를 용해시킨 후 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 약 20g의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였으며, NF- κ B/p65-, phospho-Erk-specific antibody (SantaCruz biotechnology)를 이용하여 western blot을 수행하였다. Antibody binding은 enhanced chemiluminescence(Amersham Pharmacia Biotech) 방법을 통해 검출하였으며 horseradish peroxidase- conjugated secondary antibody를 사용하였다.

III. 結果

1.茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α 발현에 미치는 영향

1)茵陳清肝湯이 TNF- α mRNA 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기 영

동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 TNF- α /GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액의 농도에 의존적으로 TNF- α mRNA 발현량이 감소되었다(Table 1).

또한 검액 10 μ g/ml를 12, 24, 48, 72시간 처리하여 세포를 회수하고 동일한 과정을 거쳐 분석한 결과, 처리 시간에 의존적으로 TNF- α mRNA 발현량이 감소되었다(Table 1).

2) 茵陳清肝湯이 TNF- α 단백질 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 μ g/ml의 농도로 48시간동안 처리한 후, ELISA법을 이용하여 TNF- α 단백질 생성량을 측정한 결과, 검액의 처리농도에 의존적으로 TNF- α

단백질 생성량이 감소되었다(Table 2).

검액 10 μ g/ml를 12, 24, 48, 72 시간 처리하여 분석한 결과, 검액의 처리시간에 의존적으로 TNF- α 단백질 생성량의 감소되었다(Table 2).

3) 茵陳清肝湯이 TNF- α mRNA의 stability에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α mRNA의 stability에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 10 μ g/ml의 농도로 actinomycin 전처리한 후 10 μ g/ml의 농도로 茵陳清肝湯을 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 TNF- α /GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액은 TNF- α mRNA의 stability에 영향을 미치지 않았다

Table 1. Effect of Injinchunggan-tang(IJCGT) on TNF- α mRNA expression

	Control	IJCGT(μ g/ml; 48 hrs)				Control	IJCGT (hrs: 10 μ g/ml)				
		1	10	50	100		12	24	48	72	
Exp.1	1.00	0.86	0.72	0.56	0.46	Exp.3	1.00	0.88	0.82	0.78	0.52
Exp.2	1.00	0.88	0.74	0.48	0.42	Exp.4	1.00	0.92	0.86	0.68	0.44

; Each value represents relative ratio of TNF- α /GAPDH when that of the control is set to 1.00.

Table 2. Effect of Injinchunggan-tang on TNF- α Protein Expression

	Control	IJCGT(μ g/ml; 48 hrs)				Control	IJCGT (hrs: 10 μ g/ml)				
		1	10	50	100		12	24	48	72	
Exp.1	365	332	274	226	182	Exp.3	365	312	288	262	216
Exp.2	404	362	268	218	180	Exp.4	404	336	294	254	212

; Each value represents TNF- α protein when that of the control is set to 365 and 404.

Table 3. Effect of Injinchunggan-tang on TNF- α mRNA Stability

	IJCGT (10 μ g/ml)	Hours after Actinomycin treatment (10 μ g/ml)					
		0	3	6	12	24	48
Exp. 1	+	1.00	0.84	0.64	0.38	0.22	0.18
	-	1.00	0.86	0.62	0.40	0.26	0.22
Exp. 2	+	1.00	0.88	0.62	0.28	0.26	0.20
	-	1.00	0.90	0.68	0.26	0.24	0.18

; Each value represents relative ratio of TNF- α /GAPDH when that of the control is set to 1.0.

(Table 3).

2. 茵蔯清肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α 신호전달계 구성유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향

1) 茵蔯清肝湯이 TNF receptor type I 및 type II mRNA 발현에 미치는 영향

茵蔯清肝湯이 HepG2 cell의 TNF receptor type I 및 type II mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기 영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 TNFR-I/GAPDH 와 TNFR-II /GAPDH 의 비율을 분석한 결과, 검액의 처리농도에 의존적으로 TNFR-I 및 II mRNA 발현양이 감소되었다(Table 4).

2) 茵蔯清肝湯이 TRAIL mRNA 발현에 미치는 영향

茵蔯清肝湯이 HepG2 cell의 TRAIL mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 $1 \times$

10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기 영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 TRAIL/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액은 TRAIL mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다 (Table 5).

3) 茵蔯清肝湯이 TRAF1 및 TRAF2 mRNA 발현에 미치는 영향

茵蔯清肝湯이 HepG2 cell의 TRAF1 및 TRAF2 mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기 영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 TRAF1/GAPDH 와 TRAF2/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액의 농도에 의존적으로 TRAF1 및 TRAF2 mRNA 발현양이 감소되었다(Table 6).

Table 4. Effect of Injinchunggan-tang on TNF Receptor Type I and II mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
TNFR-I					
Exp. 1	1.00	1.02	0.94	0.82	0.82
Exp. 2	1.00	1.08	0.96	0.80	0.74
TNFR-II					
Exp. 1	1.00	0.98	0.88	0.80	0.76
Exp. 2	1.00	0.94	0.84	0.78	0.70

; Each value represents relative ratio of TNFR-I,II/GAPDH when that of the control is set to 1.0.

Table 5. Effect of Injinchunggan-tang on TRAIL mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	1.00	0.94	1.02	1.02	0.94
Exp. 2	1.00	1.02	0.92	0.96	0.96

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

4) 茵陳清肝湯이 NIK mRNA 발현에 미치는 영향
 茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 NIK mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 NIK/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액은 NIK mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다 (Table 7).

5) 茵陳清肝湯이 A20 mRNA 발현에 미치는 영향
 茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 A20 mRNA 발현에

미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 A20/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액은 A20 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다 (Table 8).

6) 茵陳清肝湯이 FADD mRNA 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 FADD mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 $1 \times$

Table 6. Effect of Injinchunggan-tang on TRAF1 및 TRAF2 Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
TRAF1					
Exp. 1	1.00	1.06	0.92	0.80	0.76
Exp. 2	1.00	1.02	0.94	0.88	0.80
TRAF2					
Exp. 1	1.00	1.06	0.92	0.82	0.76
Exp. 2	1.00	1.02	0.88	0.80	0.74

; Each value represents relative ratio of TRAF1,2/GAPDH when that of the control is set to 1.0.

Table 7. Effect of Injinchunggan-tang on NIK mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	1.00	0.92	1.00	0.92	0.98
Exp. 2	1.00	0.92	0.98	1.06	1.04

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

Table 8. Effect of Injinchunggan-tang on A20 mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	1.00	1.04	0.98	1.04	0.96
Exp. 2	1.00	0.98	0.98	1.00	1.04

; Each value represents relative ratio of A20/GAPDH when that of the control is set to 1.0.

10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 FADD/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액은 처리농도에 의존적으로 FADD mRNA 발현양이 감소되었다(Table 9).

7) 茵陳清肝湯이 TRADD mRNA 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 TRADD mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 TRADD/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액

은 TRADD mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다 (Table 10).

8) 茵陳清肝湯이 RAIDD mRNA 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 RAIDD mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 RAIDD/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액은 RAIDD mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다 (Table 11).

9) 茵陳清肝湯이 RIP mRNA 발현에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 RIP mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 cell을 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하고 각 well에 검액을

Table 9. Effect of Injinchunggan-tang on FADD mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	1.00	0.86	0.74	0.52	0.44
Exp. 2	1.00	0.90	0.72	0.60	0.42

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

Table 10. Effect of Injinchunggan-tang on TRADD mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	1.00	1.06	1.04	0.96	0.98
Exp. 2	1.00	0.92	0.96	0.94	1.04

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

Table 11. Effect of Injinchunggan-tang on RAIDD mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	1.00	0.94	1.04	1.02	0.96
Exp. 2	1.00	1.02	0.92	1.10	1.02

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

1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이 후 세포를 회수하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 나온 PCR product를 전기영동하였다. 나타난 band의 밝기를 densitometer로 분석하여 RIP/GAPDH 비율을 분석한 결과, 검액은 RIP mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다(Table 12).

3. 茵陳清肝湯이 ethanol 과 acetaldehyde 및 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 TNF- α mRNA 발현에 미치는 영향
茵陳清肝湯이 HepG2 cell의 ethanol, acetaldehyde

및 lipopolysaccharide에 의해 유도되는 TNF- α mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 1×10^5 cells/well에 검액을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6시간동안 전처리하고, ethanol을 0, 1, 10, 50 mM의 농도로 24 시간동안 처리한 후 quantitative RT-PCR법으로 TNF- α /GAPDH 비율을 분석한 결과, 茵陳清肝湯은 ethanol에 의해 증가하는 TNF- α mRNA 발현을 처리농도에 의존적으로 감소시켰으며(Table 13), acetaldehyde를 0, 100, 200, 400 μM 의 농도로 24 시간동안 처리 한 후 quantitative RT-PCR법으로 TNF- α /GAPDH 비율을

Table 12. Effect of Injinchunggan-tang on RIP mRNA Expression

	Control	Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	1.00	0.98	0.96	0.92	1.04
Exp. 2	1.00	1.02	1.06	0.98	1.06

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

Table 13. Effect of Injinchunggan-tang on TNF- α mRNA Expression

	Ethanol (mM; 24 h)				Acetaldehyde (μM ; 24 h)			
	0	1	10	50	0	100	200	400
IJCGT($\mu\text{g/ml}$)								
0	1.00	1.23	1.86	2.26	1.00	1.42	1.94	2.42
10	0.92	1.16	1.44	1.96	0.92	1.20	1.52	1.88
50	0.86	1.14	1.22	1.42	0.86	1.12	1.36	1.44
100	0.82	1.02	1.10	1.22	0.82	0.98	1.08	1.06

; Each value represents relative ratio of TNF- α /GAPDH when that of the control is set to 1.0.

Table 14. Effect of Injinchunggan-tang on TNF- α mRNA Expression

	LPS ($\mu\text{g/ml}$; 24 h)			
	0	1	10	50
IJCGT($\mu\text{g/ml}$)				
0	1.00	1.62	2.30	4.12
10	1.02	1.42	1.94	2.32
50	0.92	1.20	1.28	1.74
100	0.86	1.12	1.08	1.36

; Each value represents relative ratio of TNF- α /GAPDH when that of the control is set to 1.0.

분석한 결과, 茵陳清肝湯은 acetaldehyde에 의해 증가하는 TNF- α mRNA 발현을 처리농도에 의존적으로 감소시켰다(Table 13). 또한 lipopolysaccharide (LPS)를 0, 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24 시간동안 처리후 quantitative RT-PCR법으로 TNF- α /GAPDH 비율을 분석한 결과, 茵陳清肝湯은 lipopolysaccharide에 의해 증가하는 TNF- α 발현을 처리농도에 의존적으로 감소시켰다(Table 14).

4. 茵陳清肝湯이 TNF- α 가 유도하는 HepG2 cell apoptosis에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 TNF- α 가 유도하는 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 1×10^5 cells/well에 검액을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6시간동안 전처리하고, TNF- α 를 0, 5, 10, 20 ng/ml의 농도로 36시간동안 처리한 후 tryphan blue exclusion assay를 이용하여 apoptotic cell을 계수한

결과, 茵陳清肝湯은 TNF- α 에 의한 간세포 apoptosis를 처리농도에 의존적으로 억제하였다(Table 15).

5. 茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 1×10^5 cells/well에 검액을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6시간동안 전처리하고, TNF- α 를 20 ng/ml의 농도로 1, 6, 12, 24 시간동안 처리한 후, quantitative RT-PCR법으로 nuclear NF- κ B/cytosolic NF- κ B의 비율을 분석한 결과, 茵陳清肝湯은 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화를 더욱 촉진하였다(Table 16).

6. 茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의한 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의한 p38 MAPK 활성화

Table 15. Effect of Injinchunggan-tang on TNF- α mRNA induced Apoptosis

IJCGT($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α (ng/m; 36 h)			
	0	5	10	20
0	23/500	164/500	225/500	338/500
10	26/500	112/500	122/500	148/500
50	20/500	110/500	136/500	144/500
100	16/500	98/500	114/500	118/500

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

Table 16. Effect of Injinchunggan-tang on NF- κ B Activity

IJCGT ($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α (hrs; 20 ng/ml)				
	0	1	6	12	24
0	1.00	1.22	1.46	3.42	5.22
10	1.24	1.32	1.56	3.88	5.72
50	1.66	1.84	1.92	4.14	5.92
100	2.12	2.18	2.72	4.34	6.12

; Each value represents relative ratio of nuclear NF- κ B/cytosolic NF- κ B when that of the control is set to 1.0.

에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 1 x 10⁵ cells/well에 검액을 0, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 6시간동안 전처리하고, TNF-α를 20 ng/ml의 농도로 1, 6, 12, 24 시간동안 처리한 후, quantitative RT-PCR법으로 p38 MAPK 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과,茵陳清肝湯은 TNF-α에 의한 p38 MAPK의 인산화를 억제하였다(Table 17).

7. 茵陳清肝湯이 TNF-α에 의한 Erk1/2 MAPK활성화에 미치는 영향

茵陳清肝湯이 TNF-α에 의한 Erk1/2 MAPK 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위해 HepG2 1 x 10⁵ cells/well에 검액을 0, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 6시간동안 전처리하고, TNF-α를 20 ng/ml의 농도로 1, 6, 12, 24 시간동안 처리한 후, Erk1/2 MAPK 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과,茵陳清肝湯은 TNF-α에 의한 Erk1/2 MAPK의 인산화를 억제하였다(Table 18).

8. 茵陳清肝湯의 TNF-α induced apoptosis에 대한 억제효과와 NF-κB 활성화와의 관련성 분석

茵陳清肝湯의 TNF-α induced apoptosis에 대한 억제효과와 NF-κB 활성화와의 관련성을 분석하기 위해 HepG2 1 x 10⁵ cells/well에 검액을 0, 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 6시간동안 전처리하고, TNF-α를 5, 10, 20 ng/ml의 농도로 24 시간동안 처리한 후, IκBΔN (dominant negative NF-κB inhibitor 유전자)의 transfection을 통한 NF-κB 억제 효과를 tryphan blue exclusion assay를 통하여 apoptosis를 분석한 결과, IκBΔN transfection을 통하여 NF-κB의 활성화를 억제시키면 apoptosis에 대한茵陳清肝湯의 억제작용이 저하되었다(Table 19).

IV. 考 察

우리나라는 경우 간염 바이러스에 의한 慢性肝病

Table 17. Effect of Injinchunggan-tang on p38 MAPK Activity Phosphorylation Level of p38 MAPK)

	TNF-α (hrs; 20 ng/ml)				
	0	1	6	12	24
IJCGT (µg/ml)					
0	1.00	1.16	1.76	2.42	2.82
10	1.04	1.04	1.08	1.22	1.36
50	1.06	1.02	1.16	1.18	1.26
100	0.96	1.06	1.08	1.24	1.36

; Each value represents relative ratio of phospho-p38/total p38 when that of the control is set to 1.0.

Table 18. Effect of Injinchunggan-tang on Erk1/2 MAPK Activity(Phosphorylation Level of Erk1/2 MAPK)

	TNF-α (hrs; 20 ng/ml)				
	0	1	6	12	24
IJCGT (µg/ml)					
0	1.00	1.42	2.02	2.62	3.98
10	1.12	1.14	1.56	1.48	1.76
50	0.98	1.18	1.32	1.48	1.58
100	0.94	1.02	1.22	1.18	1.20

; Each value represents relative ratio of phospho-Erk1/2 MAPK/total Erk1/2 when that of the control is set to 1.0.

Table 19. Effect of Injinchunggan-tang on TNF- α induces apoptosis and NF- κ B Activity

HepG2 + IJCGT (μ g/ml)	TNF- α (ng/m, 36 h)			
	0	5	10	20
0	24/500	154/500	216/500	322/500
10	22/500	124/500	154/500	174/500
50	26/500	116/500	126/500	138/500
100	26/500	106/500	110/500	140/500
I κ B Δ N-transfected HepG2+ IJCGT(μ g/ml)				
0	20/500	162/500	224/500	364/500
10	18/500	158/500	208/500	344/500
50	22/500	154/500	212/500	336/500
100	24/500	150/500	206/500	338/500

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

患의 羅患律이 세계적으로 높은 편이고, 社會적으로 중요한 역할을 담당할 40대에서 肝疾患으로 인한 死亡率이 가장 높게 나타나 社會적인 문제로 되고 있다. 이에 따라 많은 研究가 進行되고 있으며, 특히 최근에는 肝炎治療에 대한 韓藥物의 研究가 주목되고 있다^{13,8}.

茵陳清肝湯에 대한 연구로는, 金⁷이 電激性肝炎을 일으킨 마우스의 생존률을 53%로 높이는 효과가 있다고 보고하였고, 禹⁵가 慢性B형肝炎 환자에 대한 임상연구를 통하여 혈청학적 검사상 AST, ALT 등의 간기능 개선과 HBeAg의 陰轉에 대한 효과가 있다고 보고하였다. 또한 金⁶은 안전성에 관한 연구에서 임상용량으로 경구투여시 어떠한 急性 및 亞急性·慢性 經口毒性 및 부작용을 나타내지 않았다고 보고하였다. 또한 姜⁸은 茵陳清肝湯加味方이 MHV-2M 및 水浸스트레스로 실험적 肝硬變症을 유발한 마우스에 대하여 간기능개선, 간보호, 간손상회복, 재생에 유의한 효과가 있어 慢性肝炎이 肝硬變症으로 이행되는 것을 억제함을 관찰하였다.

최근에는 肝疾患을 연구하는 방향이 분자생물학적인 접근 방법으로 전환되고 있다. 방법론적으로는

세포단위의 대사 및 apoptosis에 관여하는 단백질, DNA, RNA의 활성화에 따라 발병원인과 전변과정의 상관성을 밝히려 하고 있다^{14,15}. 이에 대한 연구로 朴⁹은 茵陳清肝湯加味方이 apoptosis와 연관되는 Bcl-2, Bcl-X_L 활성을 높여 apoptosis를 억제한다고 보고하였고, 洪¹³은 茵陳清肝湯加味方이 etoposide에 손상된 간세포를 보호하고 Cpp32 protease를 억제하였으며 Cpp32, Fas를 억제하고 Bcl-2와 Bcl-X_L을 촉진시킨다고 보고하였으며, 表¹⁰는 茵陳四苓散이 Cpp32 protease를 감소시키고, Fas, Cpp32를 억제하며, Bcl-2와 Bcl-X_L을 촉진시킨다고 보고하였고, 李¹⁶는 茵陳의 분획물 중 butanol fraction에서 Fas를 매개로 하는 apoptosis에 대해 간세포 보호 효과가 가장 높다고 하였다. 高¹¹는 茵陳四苓散의 각 분획물은 HepG2 cell에서 간세포활성을 높이고 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포 손상을 억제하는 것으로 나타났으며 butanol 분획물에서 가장 현저한 것으로 보고하였고, 李¹⁷는 茵陳의 butanol fraction이 간세포의 TGF- β 1-induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 간기능을 보호하는 것으로 보고하였다.

본 연구는 최근 새로이 규명되어진 다양한 TNF- α 신호전달계 구성 및 활성조절 인자들의 발현에 미치는 영향을 조사함으로써 茵陳清肝湯의 TNF- α 로 유도되는 apoptosis 억제 과정을 밝히고자 TNF- α 신호전달계 구성 유전자의 protein 발현을 Western blot assay를 이용해 분석하고 mRNA 발현을 quantitative RT-PCR을 이용하여 정량적으로 분석하였다.

TNF- α (tumor necrosis factor- α)는 염증에 관련되어 광범위한 활성을 나타내는 사이토카인 물질로 미생물 감염에 대한 방어작용 외에도 여러 종류의 염증성 질환과 자가면역질환의 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{18,19}. TNF- α 에는 apoptosis를 유발하거나 억제하는 작용 두 가지가 있다. TNF- α 에 대한 반응은 세포 종류마다, 혹은 같은 종류일지라도 세포주마다 차이를 보여, TNF- α 로 자극하면 어떠한 세포는 apoptosis를 일으키는데 반하여 다른 세포는 세포 증식을 일으키기도 한다^{20,21}.

TNF- α 신호전달계에 대한 최근의 분자생물학적 연구를 통하여 TNF- α 신호전달계를 구성하는 새로운 구성인자와 이들의 활성을 조절하는 다양한 조절인자들이 발견되어 TNF- α 신호전달계에 대한 보다 구체적인 이해가 가능하여 졌다²³⁻²⁵.

TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)은 정상 조직과 세포들에 광범위하게 존재하는데, 특히 T세포와 B세포에 존재하며 유사분열물질(mitogen)로 자극시 T세포에서의 발현이 유도된다고 알려져 있다^{22,26}. 일반적으로 정상 조직이나 세포들은 TRAIL유발성 apoptosis에 저항성을 나타내며²⁷ 따라서 현재까지 정상조직에서의 TRAIL의 역할은 명확히 알려져 있지 않다.

TRADD(TNFR-associated death domain)는 활성화된 TNFR1에 여러 신호 전달 인자들이 결합할 수 있도록 하는 중간 매개체 역할을 한다. TRADD를 통해 반응할 수 있는 단백질에는 TRAF2(TNFR-associated factor-2), RIP(receptor-interacting protein), FADD등이 있다.

Mitrogen-activated protein kinases(MAPK)는 세

포의 성장, 분화 그리고 외부 자극으로부터의 반응 등에 관여하는 신호전달체계에 있어 중요한 효소이다²³. 적어도 3가지 종류의 중요한 MAPK가 포유류에서 존재하는데, p42/44 extracellular signal-regulated kinase(ERK)²⁴, Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase(JNK/SAPK)²⁸, 그리고 p38 kinase²⁹등이며 이들은 각각 MAP/extracellular signal-regulated kinase kinase(MEK) 1/2, MEK4/7, MEK3/6에 의해 활성화된다. 성장인자의 자극이 세포에 가해지면 ERK가 활성화되어 직접 혹은 간접적으로 세포증식과 분화에 관여하여 세포를 생존시키는 방향으로 작용하며, 반면 세포에 스트레스가 가해지면 JNK와 p38이 활성화되어 apoptosis를 유도함으로써 MAPK를 통해 세포성장 과 억제가 균형을 이루게 된다.

NF- κ B는 여러 가지 cytokine과 mitogen들에 의해 활성화되는 전사 조절자로서, 염증, 감염이나 stress 등에 대한 생체 반응에 관련된 유전자들의 핵심적 전사 조절자로 알려져 있으며³⁰, 다양한 사이토카인, 급성기 반응 단백질, 면역 글로블린 등의 전사(transcription)에 관여한다.

비활성화 상태의 NF- κ B는 inhibitor I κ B와 함께 세포질(cytoplasm) 속에 있으며, inhibitor I κ B는 NF- κ B가 핵(nucleus) 속으로 이동하는 것을 막아준다. 이러한 상태에서 활성화를 야기하는 자극이 가해지면, I κ B는 인산화(phosphorylation) 과정을 거친 후 분해되어 NF- κ B의 이동을 억제하지 못하게 되고, NF- κ B는 핵(nucleus) 속으로 이동한 후, target 유전자들의 전사(transcription)를 야기하게 된다³¹⁻³³.

NF- κ B는 endotoxin 이나 oxidative stress에 의해 활성화되어 염증 반응을 매개하는 역할을 하기도 하지만^{18,34-36}, apoptosis를 억제하여 생존에 필수적 인자로 작용하는 것으로도 알려져^{19-21,37}, 여러 가지 유전자들의 발현을 조절함으로써 다양한 간세포의 생리·병리적 반응을 매개하는 주요한 전사(transcription)조절자로 인식되고 있다. NF- κ B의 활성화는 TNF- α signaling에 의한 apoptosis에 대항하는 강력한 antiapoptotic signal로 작용한다^{19-21,37}.

NF- κ B의 subunit인 RelA(p65)가 결손된 mouse fibroblast가 TNF- α 에 의해 활성도가 급격히 감소하는 것이 관찰된 바 있고¹⁹, dominant-negative I κ B α 인 I κ B α M에 의해 NF- κ B의 활성을 강력히 억제할 경우 TNF- α induced apoptosis가 매우 활발해지는 것이 보고되었으며²⁰, 항암 치료에 있어서는 NF- κ B의 활성화를 억제함으로써 암세포의 apoptosis를 증가시킬 수 있는 것으로 알려졌다²¹. 이러한 NF- κ B 활성화에 의한 antiapoptotic effect는 간세포에서도 발생한다. NF- κ B의 subunit인 RelA가 결손된 mouse embryo는 과도한 apoptosis로 인해 간세포가 정상적인 발달을 하지 못하고 퇴화되어 사망하였으며³⁸, I κ B kinase 2 gene이 결손되어 NF- κ B 활성화가 일어날 수 없는 mouse에서도 비슷한 상황이 발생하였다³⁹. 한편, 부분적 간절제술 후 간의 재생 과정에 있어서도 NF- κ B의 활성화가 억제될 경우 간은 정상적 재생 과정을 거치지 못하고 과도한 apoptosis로 인한 세포 사멸이 발생하는 것으로 알려졌다⁴⁰.

본 실험에서는茵陳清肝湯을 HepG2 cell에 처리하여 TNF- α mRNA, protein분비에 미치는 영향을 살펴본 결과,茵陳清肝湯은 TNF- α mRNA 발현 및 단백질 생성을 억제하며 이러한 TNF- α 발현억제는茵陳清肝湯의 처리 농도 및 시간에 의존적으로 강하게 나타났다. HepG2 cell을 actinomycin으로 전처리하고茵陳清肝湯을 처리한 후 quantitative RT-PCR법으로 분석한 결과, TNF- α mRNA의 stability에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 따라서茵陳清肝湯에 의한 TNF- α mRNA 발현량의 감소는 TNF- α 유전자의 전사에 대한 抑制에 기인하는 것으로 추론된다.

TNF- α 신호전달계를 구성하는 다양한 인자들의 유전자발현에 대한茵陳清肝湯의 영향을 분석한 결과,茵陳清肝湯은 TRAIL, NIK, A20, TRADD, RAIDD, RIP 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 TNFR-I, TNFR-II, TRAF1, TRAF2, FADD 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 확인되었다.

Ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide로 처리

된 HepG2 cell에茵陳清肝湯을 처리한 결과,茵陳清肝湯은 TNF- α mRNA 발현을 처리농도 및 시간에 의존적으로 억제하였다.茵陳清肝湯이 TNF- α 가 유도하는 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향을 tryphan blue exclusion assay를 이용하여 apoptotic cell을 분석한 결과,茵陳清肝湯은 TNF- α 에 의한 HepG2 cell의 apoptosis를 처리농도에 의존적으로 억제시켰다.

또한茵陳清肝湯은 TNF- α 에 의해 유도되는 것으로 알려진 p38 및 Erk1/2 MAPK의 인산화를 억제시켰다. 이는茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의해 활성화되는 대표적 신호전달계인 MAPK 신호전달계를 억제함으로써 이를 통해 유도되는 것으로 알려진 다양한 inflammatory reaction이 차단될 수 있음을 의미한다.

茵陳清肝湯이 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 quantitative RT-PCR법으로 nuclear NF- κ B/cytosolic NF- κ B의 비율을 분석한 결과茵陳清肝湯은 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화를 더욱 촉진시켰다.

이러한茵陳清肝湯의 TNF- α induced apoptosis에 대한 억제효과와 NF- κ B 활성화와의 관련성을 분석하기 위하여 I κ B Δ N (dominant negative NF- κ B inhibitor 유전자)의 transfection을 통한 NF- κ B억제효과를 tryphan blue exclusion assay를 통하여 apoptosis를 분석한 결과, I κ B Δ N transfection을 통하여 NF- κ B의 활성화를 억제시키면 TNF- α 에 의한 간세포의 apoptosis 억제작용이 상당히 둔화 또는 억제되는 것으로 관찰되었다.

따라서茵陳清肝湯은 NF- κ B의 활성화를 통하여 TNF- α 유도성 간세포사멸을 억제하는 것으로 추론된다.茵陳清肝湯이 TNF- α 유전자의 발현 및 TNF- α 신호전달계에 대한 억제작용이 있음을 감안할 때 이러한 결과는茵陳清肝湯이 TNF- α 신호전달계와 무관한 경로를 통하여 NF- κ B를 활성화함을 추론케 한다.

이상에서茵陳清肝湯은 TNF- α 및 TNF- α 신호전달계 구성인자중의 일부 mRNA 발현에 대한 억제

작용을 가지고 있고, TNF- α 에 의한 p38, Erk1/2 신호전달계의 활성화를 차단하는 것으로 확인되었다. TNF- α 신호전달계에 대한 이러한 억제작용을 통하여 염증반응과 관련된 여러 세포내 신호전달을 차단하는 동시에茵陳淸肝湯은 NF- κ B를 활성화하는 기능을 유지함으로써 TNF- α 에 의해 유발되는 apoptosis로부터 간세포를 보호하는 기능을 나타내는 것으로 판단된다.

V. 結 論

茵陳淸肝湯이 HepG2 cell의 TNF- α 신호전달계에 미치는 영향을 분석하고자 TNF- α 유전자 및 단백질, TNF- α 신호전달계 구성유전자의 mRNA, TNF- α 발현 유도 물질에 의한 apoptosis억제, 그리고 항염증 반응과 관련된 MAPK와 NF- κ B의 활성화 등에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1.茵陳淸肝湯은 HepG2 cell의 TNF- α mRNA 발현 및 단백질 생성을 농도 및 시간에 의존적으로 억제시켰다.
- 2.茵陳淸肝湯은 TNF- α mRNA의 stability에는 영향을 미치지 않았다.
3. TNF- α 신호전달계를 구성하는 다양한 인자들 중 TRAIL, NIK, A20, TRADD, RAIDD, RIP 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 TNFR-I, TNFR-II, TRAF1, TRAF2, FADD 유전자의 발현을 감소시켰다.
- 4.茵陳淸肝湯은 ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide에 의해 촉진되는 TNF- α mRNA 발현을 처리농도 및 시간에 의존적으로 억제하였다.
- 5.茵陳淸肝湯은 TNF- α 에 의해 유발되는 HepG2 cell의 apoptosis를 처리농도에 의존적으로 억제하였다.
- 6.茵陳淸肝湯은 HepG2 cell의 NF- κ B를 활성화시킬 뿐만 아니라 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화를 촉진하였다.
- 7.茵陳淸肝湯은 TNF- α 에 의해 유도되는 것으로 알

려진 p38 및 Erk1/2 MAPK의 인산화를 억제하였다.

8. HepG2 cell의 NF- κ B 기능을 차단할 경우 TNF- α 유도성 apoptosis에 대한茵陳淸肝湯의 억제효과가 저하되었다.

이상에서茵陳淸肝湯은 TNF- α 및 TNF- α 신호전달계 구성인자의 mRNA 발현에 대한 억제작용과 TNF- α 에 의한 p38, Erk1/2 신호전달계의 활성화를 억제하여 염증반응과 관련된 여러 세포내 신호전달을 차단하는 것으로 생각된다. 또한 NF- κ B를 활성화하는 기능을 유지함으로써 TNF- α 에 의해 유발되는 apoptosis로부터 간세포를 보호하는 기능을 나타내는 것으로 판단된다.

參考文獻

1. 정영화. B형 만성간염에 대한 항바이러스 요법의 현재와 미래, 내과학의 최신지견. 서울: 한국 의학; 1999, pp.77-80
2. 김정룡. 소화기계 질환. 서울: 일조사; 2000, p.497, 540.
3. 통계청. 2002년 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2003, p.10, 11, 26.
4. 張仲景. 仲景全書. 서울: 대성문화사; 1984, p.225, 240, 249, 250, 408, 411.
5. 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳淸肝湯의 안전성에 관한 연구. 경희한의대논문집 1997;20(1):57-89.
6. 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) 1995, pp.18-53.
7. 김진주. 인진청간탕이 MHV-2로 유발된 마우스의 손상간에 미치는 영향. 서울: 경희대학교대학원; 1996.
8. 강경태, 이장훈, 우홍정.茵陳淸肝湯加味方이 實驗的 흰쥐의 肝硬 變症에 미치는 影響. 경희한의대논문집 1997;20(2):133-150.
9. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響. 대한

- 한의학회지 1998;19(1):145-164.
10. 표임정, 이장훈, 우홍정. 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1999;22(1):119-140.
 11. 고흥, 이장훈, 우홍정. 인진사령산 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-Mediated apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000;21(3):174-185.
 12. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998, p.638.
 13. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 肝細胞活性細胞週期 및 apoptosis에 미치는 影響. 대한한의학회지 1998;19(2):337-372.
 14. Leist M, Gartner F, Naumann H, Bluthmann H, Voget K, Brigelrus-Flohe R et al. Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. Gastroenterology 1997;112:923-934.
 15. Lin D, Fiscella M, O'Connor P.O, Jackman J, Chen C, Luo Ling L et al. Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(21):10079-10083.
 16. Yi Jong-Hoon, Lee Jang-Hoon, Woo Hong-Jung. Effects of Five Fraction of Artemisia Capillaris THUMB on Fas-mediated Apoptosis in HepG2 Cells. Journal of Oriental Medicine 1999;4(1):41-45.
 17. 이지현, 이장훈, 우홍정. 茵陳분획물이 인체간세포의 TGF- β 1 induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000;20(1):53-61.
 18. Nanji AA, Zhao S, Sadrzadeh SMH, Waxman DJ. Use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction to evaluate in-vivo cytokine gene expression in rats fed ethanol for long periods. Hepatology 1994;19:1483-7.
 19. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science 1996;274:782-4.
 20. 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.
 21. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell 1996;87:565-76
 22. Mariani SM, Krammer PH. Surface expression of TRAIL/Apo2 ligand in activated mouse T and cell. Eur J Immunol 1996;28:1492-1498.
 23. Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinase are regulated. J Biol Chem 1995;270:14843-14846.
 24. Dabrowski A, Groblewski GE, Schafer C, Guan KL, William JA. Cholecystokinin and EGF activate a MAPK cascade by different mechanisms in rat pancreatic acinar cells. Am J Physiol 1997;273:1472-1479.
 25. Schilling PJ, Murray JL, Markowitz AB. Novel tumor necrosis factor toxic effects. Pulmonary hemorrhage and severe hepatic dysfunction. Cancer 1992;69:256-260.
 26. Jeremias I, Herr I, Boehler T, Derbatin KM. TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis in human T cell. Eur J Immunol 1998;28:143-152.
 27. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 1995;3:673-682.
 28. Dabroski A, Grady T, Logsdon CD, Williams JA. Jun kinase are rapidly activated by cholecystokinin in rat pancreas both in vitro and vivo. J Biol Chem 1996;271:5686-5690.
 29. Schafer C, Ross SE, Bragado MJ, Groblewski GE, Ernst SA, Williams JA. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp27

- pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem* 1996;273:24173-24180.
30. Baldwin AS, Azizkhan JC, Jensen DE, Beg AA, Coodly LR. Induction of NF-kappa B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991;11:4943-51
 31. Baeuerle PA, Baltimore D. NFkB: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
 32. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor kB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336:1066-71.
 33. French SW, Miyamoto K, Tsukamoto H. Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10(suppl6):13S-9S.
 34. McClain CJ, Hill D, Schmidt J, Diehl AM. Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1993;13:170-182.
 35. Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, et al. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999;30:934-43.
 36. Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, et al. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 1997; 112:943-51.
 37. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kB. *Science* 1996;274:784-7.
 38. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kB. *Nature* 1995;376:167-70.
 39. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the Ikb kinase 2 gene. *Science* 1999; 284:321-5.
 40. Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, et al. NF-k B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998; 101:802-11.