

## 사람 간암 세포주인 HepG2에 대한茵陳蒿湯의 항암 효과

윤현정<sup>#</sup>, 김병완, 이창현, 정재하, 허숙경, 박원환, 박선동<sup>\*</sup>

동국대학교 한의과대학 방제학교실

### Herbal medicine In-Jin-Ho-Tang as a potential anti-cancer drug by induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells.

Hyun-Joung Yun<sup>#</sup>, Byung-Wan Kim, Chang-Hyun Lee, Jae-Ha Jung  
Sook-Kyung Heo, Won-Hwan Park, Sun-Dong Park<sup>\*</sup>

Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objective:** Hepatocellular carcinoma is the most common primary malignant tumor of the liver worldwide. In-Jin-Ho-Tang (IJHT) has been used as a traditional Chinese herbal medicine since ancient time, and today it is widely applied as a medication for jaundice which is associated with inflammation in liver. In this study, I investigated whether methanol extract of IJHT induced HepG2 cancer cell death.

**Methods:** Cytotoxic activity of IJHT on HepG2 cells was using XTT assay. Apoptosis induction by Ros A in HCT116 cells was verified by the induction of cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP), and activation of caspase-3, -8 and -9. The release of cytochrome c from mitochondria to cytosol, the level of Bcl-2 and Bax and the expression of p53 and p21 were examined by western blotting analysis. Furthermore, MAPKs activation was analyzed by western blotting analysis.

**Results:** IJHT induced apoptosis in HepG2 cells. And treatment of IJHT resulted in the release of cytochrome c into cytosol, decreased anti-apoptotic Bcl-2, and increased pro-apoptotic Bax expression. IJHT markedly inactivated extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), and activated p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. Sodium orthovanadate (SOV), a phosphatase inhibitor, to reverse IJHT-induced ERK1/2 inactivation and SB203580, a specific p38 MAP kinase inhibitor efficiently blocked apoptosis of HepG2. Thus, IJHT induces apoptosis in HepG2 cells via MAP kinase modulation.

**Conclusion:** These results indicated that IJHT has some potential for use as an anti-cancer agent.

**Key Word :** In-Jin-Ho-Tang (IJHT), apoptosis, caspase, MAPKs

\*교신저자 : 박선동. 동국대학교 한의과대학 방제학교실  
· Tel : 054-770-2654. · e-mail : sundong@dongguk.ac.kr

#제1저자 : 윤현정. 동국대학교 한의과대학 방제학교실  
· Tel : 054-770-2654. · e-mail : sksms97@hanmail.net

· 접수 : 2007년 8월 3일 · 수정 : 2007년 9월 20일 · 채택 : 2007년 9월 21일

### 서론

茵陳蒿湯은 『傷寒論』<sup>1)</sup>에서 최초로 언급된 方劑로, 茵陳 (*Artemisiae Capillaris Herba*), 梔子 (*Gardeniae Fructus*) 그리고 大黃 (*Rhei Radix et Rhizoma*) 으로 구성되었으며 주로 급성바이러스성 간염, 만성간염, 간경화, 담낭 및 담도질환 등에서 볼 수 있는 주증상인 黃疸에 활용되어 온 처방이다<sup>2)</sup>. 본방은 현대적으로 항염증제, 해열제, 이뇨제로서 담즙분비를 촉진시키는 동시에 담낭수축작용이 있고 아울러 간염에 대한 간 보호 작용이 있다고 알려져 있다<sup>3)</sup>.

개별 약물의 약리작용으로, 茵陳蒿 내의 esculetin은 담즙의 분비를 촉진하고, 山梔子の geniposide와 협력하여 담즙분비를 더욱 촉진하며, 또한 담관 말단의 Oddi 괄약근을 이완하여 담즙의 배설을 촉진한다. 또한 혈중의 cholesterol과  $\beta$ -lipoprotein을 낮추어 혈관 벽에 지방이 침착하는 것을 방지한다. 梔子の 성분인 crocin, crocetin는 담즙의 분비와 배설을 촉진하고 혈중 bilirubin치를 저하시켜 황달을 소퇴시킨다. 그리고 大黃중의 sennoside는 대장 내에서 rhein anthrone이 되어 장 점막을 자극하여 연동운동을 항진시키고 수분 및 Na흡수를 저해하여 설사를 유발한다. 또한 간 손상을 보호하고 황달성 간염을 치료하며, B형 간염에 대한 억제작용이 있다<sup>4)</sup>.

茵陳蒿湯은 이들 약물의 치료 작용을 근거로 배합됨으로서 효과의 극대화와 부작용의 최소화, 그리고 작용부위와 병리인자에 대한 치료정확도를 증대시킬 수 있는 처방이다.

본 처방과 관련된 국내 연구 결과로는 담석형성의 억제가능성<sup>5)</sup>, 항고지혈증, 간 기능 개선효과<sup>6-7,9)</sup>, 항균활성<sup>8)</sup>이 보고되어 있다.

한편 국제적 연구동향을 보면, 茵陳蒿湯은 transforming growth factor beta 1 에 의해 유도된 rat의 간 세포고사에 대한 보호효과<sup>10)</sup>, concanavalin A로 유도한 mouse의 간염 모델에서 혈청의 염증성 cytokine인 interleukin-2 (IL-2), interleukin-2 (IL-12)와 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )의 수준을 낮추고, 또한 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)와 lactate dehydrogenase (LDH) 등의 수준을 낮추는데 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>11)</sup>. 또한 담낭 폐쇄증 환자 (biliary atresia patients)가 2년에서 4년간 茵陳蒿湯을 복용했을 경우 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), gamma glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP)와 hyaluronic acid (HA) 등의 효소 수준이 낮아져서 병증이 상당히 호전되는 것을 보였다<sup>12)</sup>. 이것은 茵陳蒿湯이 담낭 폐쇄증 환자에게서 간 보호 효과와 항섬유 효과 (anti-fibrotic effects)를 높여 준다는 것을 의미한다. 또한 茵陳蒿湯은 직접 간 섬유 작용을 억제할 뿐만 아니라<sup>13)</sup>, 동물모델에서 담즙분비를 촉진시킨다는 보고도 있다<sup>14)</sup>. 일본에서는 간경화 환자나 C형 간염 환자들에게 茵陳蒿湯을 처방하고 있으나<sup>15-16)</sup>, 茵陳蒿湯이 간암세포에 어떠한 영향이 있는 지에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 간암세포의 사멸에 있어서 관련 유전자 및 단백질의 작용기전을 분자생물학적으로 규명함으로써 茵陳蒿湯이 간암세포인 HepG2에 어떠한 영향이 있는지에 대해서 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 본초학 교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 茵陳蒿湯의 구성 및 총량 (인진 : 치자 : 대황 = 10 : 5 : 3 in weight)은 Table. 1과 같다<sup>17)</sup>. 약재 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 여과하여 농축한 것을 동결 건조하여 분말을 얻어 실험에 사용하였다 (수율 : 17.8%). 이 분말은 세포배양액인 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM)에 녹여 사용하였다.

Table 1. Composition and contents of Injinhotang (IJHT)

약명	생약명	량 (g)
인진	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	150
치자	<i>Gardeniae Fructus</i>	75
대황	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	45
Total		270

##### 2) 시약

Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand

Island, USA)에서, 배양조는 Corning사 (Rochester, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였고, NP-40, CAPS, protease inhibitors 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 1차 항체인 anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-Bax는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서, anti-Bcl-2와 anti-cytochrome c는 BD PharMingen사 (San Jose, USA)에서, anti-PARP, anti-phospho-Raf, anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-38, anti-p38, anti-beta-actin은 Cell Signaling Technology사 (Beverly, USA)에서 구입하였다. 2차 항체인 anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody, anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. XTT assay용 kit는 Amersham Pharmacia Biotechnology사 (Arlington Heights, USA)에서 구입하였고, protein assay reagent는 Bio-Rad사 (Hercules, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포배양

HepG2 (human liver cancer cell line, KCLB)와 Chang (human liver cell line)을 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다. 실험에 사용하기 전에 serum free media로 교체한 후 16시간 동안 starvation하였다.

### 2) XTT assay

茵陳蒿湯이 HepG2와 Chang에 대한 세포독성을 갖는지 알아보기 위해 XTT assay를 수행하였다. Well당 1×10<sup>5</sup>개의 cell을 96 well plate에 분주하고 serum free media로 16시간 starvation 시킨 후, 각 추출물을 농도별, 시간별로 처리하였다. Well당 100 μl의 XTT labeling mixture (5 ml XTT labeling reagent + 0.1 ml electron coupling reagent)를 처리하여 4시간 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에

서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

### 3) Trypan blue exclusion assay

60 mm 배양조에 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 세포를 분주하고 serum free media로 16시간 동안 starvation 시킨 후, 각 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리한 후 원심 분리하여 세포들을 모아서 trypan blue dye (0.4%)로 염색하여 hemacytometer를 사용해서 생존한 세포의 수를 counting하였다.

### 4) 현미경 관찰

6 well 배양조에 5×10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하고 serum free media로 16시간 동안 starvation 시킨 후,茵陳蒿湯을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 광학 현미경 (Nicon, Japan)을 사용하여 세포의 형태 변화를 관찰하였다.

### 5) Cytochrome c release analysis

茵陳蒿湯을 처리한 세포를 ice-cold PBS로 두 차례 세척하여 원심분리를 통해 모은 후, lysis buffer (250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin, and 10 μg/ml aprotinin)를 넣고 pipeting을 통해 세포를 풀어준 다음 4°C에서 30분간 반응시킨다. Homogenator를 이용하여 세포를 균질화시킨 후 4°C, 1,200×g에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 따서 다시 4°C, 100,000×g에서 1시간 동안 원심분리한다. 얻어진 상층액으로 12.8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행한 후, cytochrome c 항체를 사용한 immunoblotting을 통해 세포질로 방출되는 cytochrome c를 분석하였다.

### 6) Western blot analysis

전기영동을 위한 단백질 시료의 추출은 처리 시간별로 세포를 ice-cold tris buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl)으로 3회 세척한 후, lysis buffer (TBS, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 μg/ml aprotinin,

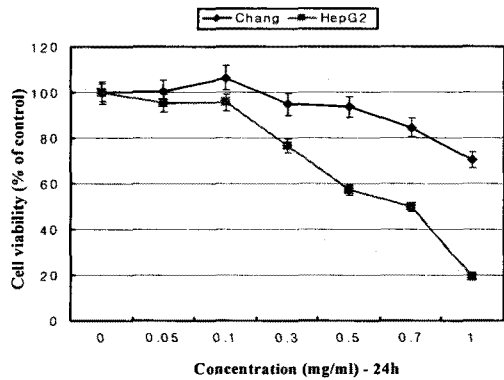
10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin 및 1 mM PMSF)를 넣어 4°C에서 30분간 반응시키고 12,000 $\times$ g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액)에서 1시간 동안 반응시킨 후, 각 검증 단백질에 대한 항체를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 40분간 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응 시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 확인하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다.

## 결 과

### 1.茵陳蒿湯의 HepG2 세포에 대한 독성

茵陳蒿湯이 간암 세포주인 HepG2와 정상 간세포인 Chang의 세포 생존율에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보기 위하여 다양한 농도 (0.05~1 mg/ml)로 24시간, 48시간 동안 처리하여 XTT assay를 수행하였다. 그 결과, HepG2 세포의 경우 24시간 처리 시, 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml의 농도에서 각각 72.3%, 54.3%, 42.2%까지 세포 생존율이 감소되었다 (IC<sub>50</sub>=0.5 mg/ml). 반면 Chang 세포의 경우에는 0.5 mg/ml의 농도까지 세포 생존율에 거의 영향을 미치지 않았고 1 mg/ml에서 66.7%까지 감소되었다 (Figure 1(A)). IC<sub>50</sub> 값인 0.5 mg/ml 처리하여 시간별 (0~48시간)로 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과, 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율의 감소를 보였다 (Figure 1(B)). 또한 trypan blue 염색을 수행한 결과,茵陳蒿湯의 농도가 증가함에 따라 살아있는 세포의 수가 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ((Figure 2).

(A)



(B)

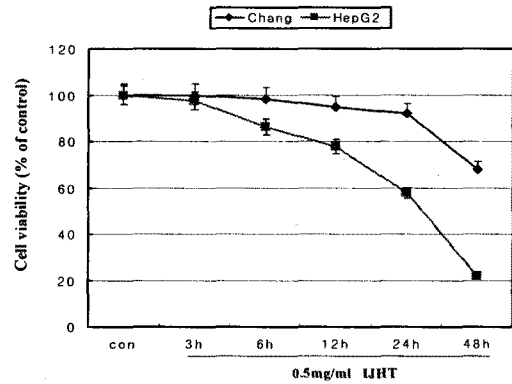


Figure 1. Effect of In-jin-ho-tang (IJHT) on the cell viability of HepG2 cells by XTT assay

HepG2 cells ( $1 \times 10^5$  cells/plate) were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml) of IJHT for 24 h (A) and 0.5 mg/ml IJHT for various time (3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h). Cell viability was measured by XTT assay as described in materials and methods. Data were chosen from five independent triplicate experiments.

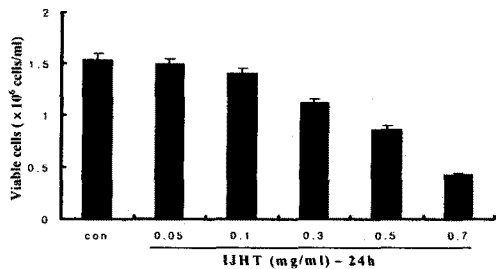


Figure 2. Effect of IJHT on the cell viability of HepG2 cells by trypan blue exclusion assay

HepG2 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1,

0.3, 0.5, 0.7 mg/ml) of IJHT for 24 h. After 24 h, the cells were stained with trypan blue (0.4%, w/v) for 5 min at room temperature before the cells were examined under the microscope. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion, and the results were expressed as live cell number. Values are mean±S.D.

## 2.茵陳蒿湯에 의한 세포의 형태적 변화

프로그램화된 세포의 죽음은 구조적인 형태의 변화를 유도하는데, 죽어가는 세포는 인접한 세포와 구조적으로 분리된다. 이러한 apoptosis 과정동안 세포질의 수축이 일어나 결국 apoptotic body를 형성하는 것이 가장 특징적인 현상이다.茵陳蒿湯을 농도별로 24시간 동안 처리한 후 광학 현미경을 통해 세포의 형태 변화를 관찰한 결과, Figure 3에서 보는 바와 같이 농도 의존적으로 관찰되는 세포의 수가 감소하였고, 세포질의 수축에 의해 세포의 형태적인 변화가 일어나는 것으로 관찰되었다.

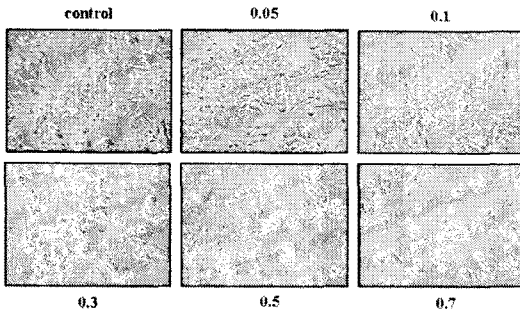


Figure 3. Morphological changes of HepG2 cells by IJHT

HepG2 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml) of IJHT for 24 h. IJHT exposed cells undergoing apoptosis are shown by their characteristically shrunken cellular shape. Morphological changes were observed by microscopy at ×400 magnification.

## 3.茵陳蒿湯에 의해 유도되는 HepG2의 세포사멸

茵陳蒿湯에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 HepG2 세포에茵陳蒿湯을 농도별로 처리한 후 단백질의 발현양상을 조사하여 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. 세포는 세포사멸 과정 동안 회복 기능을 상실하게 되는데, 여기에 중요한 polymerase가 poly(ADP-ribose) polymerase

(PARP)이다. 이 PARP의 cleavage는 세포사멸을 확인할 수 있는 하나의 지표가 된다. Caspases는 cystinyl aspartate-specific protease로 세포질에서 pro-form으로 존재하고 특정 위치의 proteolytic 과정에 의해 활성화된다. 이로 인해 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성 유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다. 이에 항체를 이용한 western blot을 통해 procaspase-3, -8, -9의 발현양상과 PARP의 cleavage를 관찰하였다. 그 결과Figure 4에서 보듯이,茵陳蒿湯의 처리농도가 증가함에 따라 procaspase-3, -8, -9의 발현이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 PARP의 경우 0.3 mg/ml의 농도에서 cleavage가 관찰되기 시작하여 0.7 mg/ml까지 농도 의존적으로 cleavage가 증가되는 것을 볼 수 있었다.

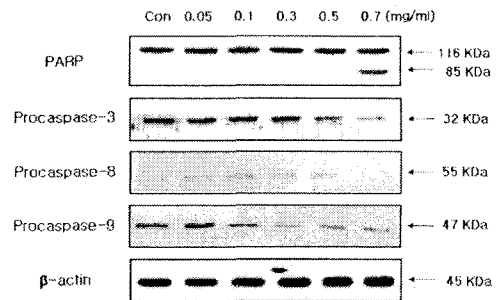


Figure 4. IJHT induces apoptosis in HepG2 cells

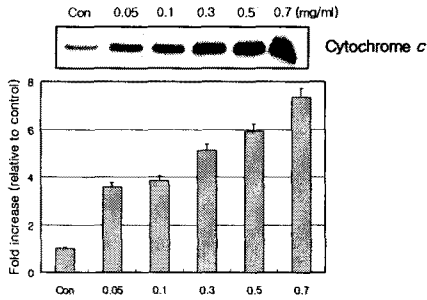
HepG2 cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml) of IJHT for 24 h. Equal quantity of proteins of the total cell lysates was analyzed by 10% SDS-PAGE. The cleavages of PARP and the reduction of procaspase-3, -8 and -9 were detected by Western blot. b-actin levels were used as internal markers for loading variation.

## 4.茵陳蒿湯이 cytochrome c의 방출과 Bcl-2 family의 발현 변화에 미치는 영향

茵陳蒿湯에 의해 유도되는 apoptosis가 세포내 어떠한 신호전달을 통해 일어나는지 알아보기 위하여 세포사멸의 경로 중 하나인 mitochondrial apoptosis에 관여하는 Bcl-2 family의 발현양상과 mitochondria로부터 세포질로 cytochrome c가 방출되는 정도를 알아보았다. 그 결과, 처리농도가 증가함에 따라 cytochrome c의 방출량이 점차 증가하였다 (Figure

5(A)). 또한 cytochrome c가 mitochondria로부터 세포질로 방출되는 것을 저해하는 단백질인 Bcl-2는 농도 의존적으로 발현이 감소되었고, pro-apoptotic Bax가 점차적으로 증가되는 것으로 관찰되었다 (Figure 5(B)).

(A)



(B)

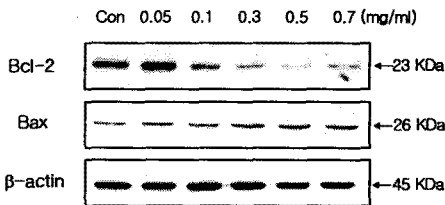


Figure 5. Effect of IJHT on cytochrome c release from mitochondria to cytosol and the expression of Bcl-2 and Bax in HepG2 cells

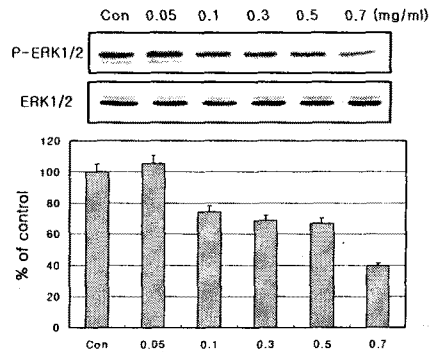
Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml) of IJHT for 24 h. Equal quantity of proteins was analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Cytosolic fractions were isolated and analyzed by Western blot using an anti-cytochrome c antibody (A). Western blotting analysis was used to assess the protein expressions.

### 5.茵陳蒿湯에 의한 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성 변화

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다. HepG2 세포에茵陳蒿湯을 처리한 경우 MAP kinase의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 anti-P-ERK1/2와 anti-P-p38, anti-P-JNK을 이용한 western blot을 수행하였다. 그 결과, P-JNK는 detection되지 않았고, P-ERK1/2

가 농도 의존적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Figure 6(A)). 반면, P-p38 MAP kinase는 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 6(B)).茵陳蒿湯 처리 시 MAP kinases의 활성에 변화를 나타내는 것으로 보아 이러한 활성의 변화가 세포의 사멸유도와 관련이 있을 것으로 생각되었다. 이에 각각의 MAP kinase의 activator 또는 inhibitor를 처리한 후茵陳蒿湯에 의해 유도되는 HepG2 세포 생존율의 변화와 세포사멸에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. 5 μM SOV (sodium orthovanadate ; Na3VO4)와茵陳蒿湯을 함께 처리하여茵陳蒿湯에 의한 ERK1/2 활성의 감소를 저해시켰을 경우, PARP cleavage가 감소하였고 세포 생존율의 감소 효과가 억제되었다. 또한 p38 MAP kinase의 특이적 저해제인 SB203580을茵陳蒿湯과 함께 처리하여茵陳蒿湯에 의해 증가되는 p38의 활성을 감소시킨 경우에도 PARP cleavage가 감소하였고 세포 생존율의 감소가 억제되는 것으로 나타났다 (Figure 7). 이러한 결과들로 보아,茵陳蒿湯에 의해 유도되는 MAP kinase 활성의 변화가 HepG2 세포의 apoptosis에 직접적으로 영향을 주는 것으로 볼 수 있다.

(A)



(B)

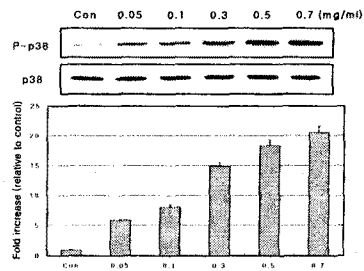


Figure 6. Changes of the activities of ERK1/2 and p38 MAP

kinase during IJHT-induced apoptosis

HepG2 cells were incubated in the absence or presence of various concentrations of IJHT for 24 h. MAPKs activation was analyzed by Western blot.

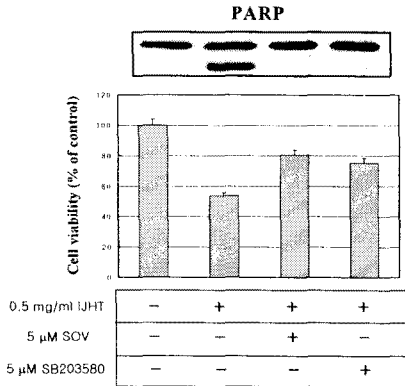


Figure 7. Effect of activator or inhibitors of MAP kinases on IJHT-induced apoptosis and cell viability of HepG2

HepG2 cells were cotreated with IJHT and 5 μM SOV (ERK activator) and 5 μM SB203580 (specific inhibitor of p38) for 24 h. The cleavages of PARP were analyzed by Western blot. Cell viability was measured by XTT assay.

6. 茵陳蒿湯이 Ras/Raf/ERK pathway에 미치는 영향

Ras/Raf/ERK pathway는 대부분의 성장인자 수용체들의 downstream으로 세포의 생존과 성장, 분화, 형질전환 등을 조절하는데 필수적인 신호전달 체계이다. 茵陳蒿湯을 처리한 후, Ras/Raf/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 그 결과, 처리한 茵陳蒿湯의 농도가 증가함에 따라 P-Raf, P-ERK의 발현이 감소하였다 (Figure 8).

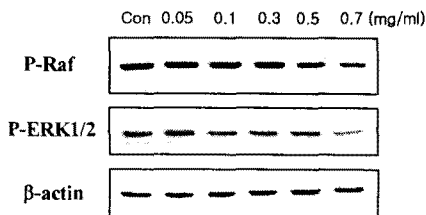


Figure 8. Effect of IJHT on Ras/Raf/ERK pathway in HepG2 cells

Cells were treated with various concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg/ml) of IJHT for 24 h. Equal quantity of proteins of the total cell lysates was analyzed by 10% SDS-PAGE. Western blotting analysis was used to assess the protein expressions. β-actin levels were used as internal markers for loading variations.

고찰

간질환은 우리나라에서 암과 당뇨병 다음으로 높은 발병율과 사망률을 나타내고 있으며 계속적으로 증가 추세를 나타내고 있다. 자각증상이 거의 없이 진행되다가 증세 발현 시에는 치료가 매우 어려운 상태가 된다. 또한 현재까지 뚜렷한 치료제가 개발되지 않고 있으며 대중적인 치료만이 가능한 상태라는 점이 이 질환의 극복에 커다란 문제점으로 지적되고 있다<sup>18)</sup>.

황달은 주로 급성바이러스성 간염, 만성간염, 간경화, 담낭 및 담도질환 등에서 볼 수 있는 주요 증상이다. 그러므로 한의학에서 간질환은 황달과 밀접한 연관성이 있는 것으로 해석할 수 있으며, 이와 같은 간담질환에 활용한 대표적인 처방중의 하나가 茵陳蒿湯이다<sup>19)</sup>.

茵陳蒿湯은 비교적 체력이 있는 사람에게 상복부부터 흉부에 걸쳐 팽만감, 불쾌감을 호소하고, 오심, 변비를 수반하는 경우에 사용되는데, 황달이 있는 경우와 구갈, 요량감소, 피부가려움 등을 동반하는 경우에 활용된다. 임상적으로 자기면역성 간염이나 담즙울체에 활용되며, 약리학적으로는 실험적 간, 담관 장애에 대한 예방효과가 있는데, 특히 ICR계 백내장 자연발증 Rat에게 galactosamine을 투여하여 간 장애를 발생시킨 실험계에서 일반상태, 간의 실질 장애상, 혈액 생화학적 소견으로부터 galactosamine의 간장애방지가 있으며, 간즙울체 모델인 α-Naphthylisotiocyanate (ANIT) 유발 rat에게 투여하자 ANIT로 인하여 야기된 체중감소, 혈청생화학치 (ALP, T-bilirubin 등)의 증가 및 여러 조직학적 변화를 현저하게 억제하였으며, rat의 십이지장내에 투여하자 담즙 분비촉진작용을 나타내었고, 또한 최담즙울체인자에 의한 간내담즙 배설의 억제는 완화되었다<sup>20)</sup>.

茵陳蒿湯의 구성약물들의 특징을 살펴보면 우선 인진호는 chlorogenic acid, caffeic acid, p-hydroxyacetophenone, 6,7-dimethoxy-coumarin, capillarisin과 작용이 경미한 salicylic acid 등이 함유되어 있다. 약리적으로 이담, 간 기능 보호 작

용, 항균, 항바이러스 작용, 심혈관에 대한 작용으로 혈압강하 및 지방제거효과, 평활근에 대한 작용, 그리고 진통, 소염, 해열작용이 있다. 치자의 주성분은 iridoidal glycosides로 gardenoside, geniposide, shanzhiside, gardoside 등이 함유되어 있다. 약리학적으로 항균, 항바이러스작용, 소염작용, 이담작용, 췌장분비촉진 작용, 진정 해열작용, 혈압강하작용, 간 기능 보호 작용, 위 기능에 대한 영향, 사하작용, 심근수축억제작용 등이 있으며, 급성독성은 매우 작다. 대황의 주성분은 anthraquinone 유도체로서 총량은 약 3~5%이다. 두 가지 상태로 존재하는데, 일부는 유리 상태로 존재하고, 대부분은 포도당과 결합하여 anthracene glycosides를 이룬다. 유리형의 aglycone에는 rhein, aloe-emodin, physcion, chrysophanol 등이 있다. 약리적으로는 사하, 항균, 이담, 지혈, 항암, 이노, 간 기능 보호, 혈청지질강하, 면역조절, 소화효소분비억제 등의 작용이 있으며, 독성도 비교적 낮다<sup>21)</sup>. 이들 세 가지 약물의 장점을 이용하여 방제화한 것이茵陳蒿湯인데, 간암세포주의 하나인 HepG2에서,茵陳蒿湯이 cell cycle에 어떻게 작용하는가에 대한 보고는 보이지 않았다.

최근 한의학에서 간질환에 대한 분자생물학적 기전규명을 위한 시도가 많은데 특히 淸肝解酒湯<sup>22)</sup>,茵陳淸肝湯加味方<sup>23)</sup>,茵陳四苓散<sup>24)</sup>,茵陳淸肝湯<sup>25)</sup>生肝健脾湯<sup>26)</sup> 등의 처방을 활용한 실험으로 그 유의성을 탐색하였으며, 특히 이<sup>27)</sup>는 인진이 간세포의 TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 간세포손상을 억제한다고 하였다.

본 연구에서는茵陳蒿湯의 효능을 평가하기 위한 방법의 일환으로 HepG2 세포의 활성 및 증식, apoptosis에 미치는 영향을 조사하였고, 그 분자생물학적 기전을 파악하기 위해 cell cycle에 관여하는 신호전달계에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

먼저,茵陳蒿湯이 간암 세포주인 HepG2와 정상 간세포인 Chang cell의 생존율에 어떠한 영향을 주는 지 알아 보았다. 0.05~1 mg/ml 농도로 24시간, 48시간 동안 처리하여 XTT assay를 수행하였다. 그 결과, HepG2의 경우 24시간 처리 시, IC50값이 약 0.5 mg/ml이었다. 반면 Chang의 경우에는 0.5 mg/ml의 농도까지 세포 생존율에 거의 영향을 미치지 않았다. IC50 값인 0.5 mg/ml 처리하여 시간별 (0~48시간)로 세포 생존율에 미치는 영향을 알아본 결과, 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율의 감소

를 나타내었다. 또한 trypan blue 염색과 현미경을 통한 형태 변화를 관찰한 경우에도茵陳蒿湯의 농도가 증가함에 따라 살아있는 세포의 수가 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 보아,茵陳蒿湯은 0.5 mg/ml의 농도까지 정상 간 세포의 생존율에는 거의 영향을 주지 않으면서 간암 세포주인 HepG2의 생존율을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

다음으로,茵陳蒿湯에 의해 유도되는 세포 생존율의 감소가 apoptosis에 의한 것인지 알아보았다. Apoptosis는 일반적으로 necrosis와 구분되는 것으로 programmed cell death를 가리킨다<sup>28)</sup>.

Apoptosis가 necrosis와 구분되는 형태적 특징의 차이는 초기에 일어나는 cell blebbing 현상, 즉 염색질이 응축되어 핵막의 가장자리에 초승달 모양으로 분포하거나 절단되고, DNA fragmentation이 일어나는 것이다. 이어서 세포표면이 붕괴되어 다양한 크기의 apoptotic body들을 형성하게 되고, 이들은 주변의 세포 혹은 조직 내 대식 세포에 의해 탐식되어 염증반응 없이 제거된다. 정상적인 조직의 경우, apoptosis의 조절에 이상이 생기게 되면 세포의 증식과 사멸의 균형이 깨어지게 됨으로써 악성 종양으로 변형된다<sup>29)</sup>. 따라서 암세포의 apoptosis를 인위적으로 유도함으로써 세포의 증식을 억제할 수 있다. Apoptosis의 지표가 되는 PARP의 발현양상과 caspases의 변화를 각각의 항체를 사용한 western blotting 수행을 통하여 알아보았다. 그 결과,茵陳蒿湯의 농도에 의존적으로 procaspase-3, -8, -9의 발현이 감소하였고, 0.3 mg/ml의 농도에서 PARP cleavage가 관찰되기 시작하여 0.7 mg/ml까지 농도 의존적으로 증가되는 것을 볼 수 있었다.

Apoptosis가 일어나는 세포의 경우 mitochondria l membrane depolarization이 생기고, mitochondria 내의 cytochrome c가 세포질로 방출된다<sup>30)</sup>.茵陳蒿湯을 처리한 후 cytochrome c의 방출과 이에 관여하는 Bcl-2와 Bax의 발현양상을 조사하였다.茵陳蒿湯의 농도가 증가함에 따라 세포질로 방출되는 cytochrome c의 양이 증가하였고, anti-apoptotic Bcl-2의 발현 감소와 pro-apoptotic Bax의 발현 증가가 관찰되었다. 이로써茵陳蒿湯에 의한 apoptosis가 mitochondria를 경유한다는 것을 알 수 있었다.

MAP kinase family (MAPK)는 serine/threonine kinase이며 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAP kinase, c-jun N-terminal



kinase (JNK)로 크게 구분된다. MAPK 구성요소들은 세포의 증식, 분화, 그리고 세포의 생존과 세포사멸을 포함하는 다양한 생물학적 기능을 조절한다고 알려져 있다<sup>31)</sup>. 세포는 세포내 전달명령에 의해 세포 밖의 신호를 세포내로 보내게 된다. 그러한 신호의 전달 변환에 종종 이용되는 대표적인 경로에 MAPK가 위치하고 있다. MAPK의 활성화는 세포내 인산화에 의해 기인한다. 활성화된 MAPKs는 다른 protein kinase들과 핵 단백질, 또는 전사인자를 활성화시켜 신호를 전달하게 된다. 이러한 MAPK의 활성화과정은 빠르며 세포가 환경적 변화에 반응할 수 있도록 해 준다. 먼저, ERK는 성장 요인들의 반응에 의해 활성화되는데, 이들의 활성화는 tyrosine 인산화와 상호 작용한다. ERK1/2는 세포 내에서 광범위하게 발현되고, 유사분열과 감수분열의 조절, postmitotic 기능에 관여하며, 성장인자와 cytokine, 바이러스 감염, 형질전환 물질, carcinogen 등과 같은 많은 자극에 의해 활성화된다<sup>32)</sup>. ERK1/2는 protooncogene인 Ras에 의해 활성화된다. 활성화된 Ras의 돌연변이는 많은 암세포에서의 공통된 특징으로 알려져 있다. 암세포에서의 Ras는 ERK1/2 경로를 활성화시키고 암세포의 증식률을 높이는 데에 기여한다. 따라서 ERK 경로의 저해는 잠재적으로 항암 치료의 target이 될 수 있을 것이다. 다음으로 p38 MAP kinase는 네 가지의 동위효소를 가지고 있으며 stress, heat shock, radiation 등과 같은 일련의 자극에 의해 활성화되어 염증반응, apoptosis, 세포 분화 등 다양한 생물학적 반응을 유도한다고 알려져 있다<sup>33)</sup>. 따라서, 茵陳蒿湯이 MAPK의 활성화에 어떠한 영향을 주는 지 알아보았다. 그 결과, phospho-ERK1/2는 농도 의존적인 감소를 보였고, phospho-p38 MAP kinase는 증가되었다. 茵陳蒿湯이 Ras/Raf/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아본 결과, 농도 의존적으로 Raf와 ERK 활성이 감소되었다. MAP kinase의 이러한 활성 변화로 보아 MAP kinase의 활성변화가 茵陳蒿湯에 의한 apoptosis에 영향을 줄 것으로 생각되어 p38의 specific inhibitor인 SB203580과 phospho-ERK1/2의 activator인 SOV를 茵陳蒿湯과 cotreat한 후 PARP와 procaspase 3의 발현양상과 세포생존율의 변화를 조사하였다. 그 결과, p38의 활성을 저해한 경우 茵陳蒿湯에 의한 apoptosis가 감소하는 것으로 나타났고, 茵陳蒿湯에 의해 감소되는 ERK1/2의 활성을 회복시킴으로써 apoptosis가 감소되었으며 세포생존율 또한 회복되었다. 이러한

결과로 보아 茵陳蒿湯에 의해 변화되는 MAPK의 활성이 HepG2 세포의 apoptosis를 유도하는 데 작용하는 것으로 생각할 수 있다.

이 같은 결과로 보아, 茵陳蒿湯은 사람 간암 세포주인 HepG2의 세포 생존율을 감소시키고, mitochondrial pathway를 통한 apoptosis를 유도할 수 있으며, 또한 MAP kinase의 활성을 조절함으로써 apoptosis에 영향을 줄 것으로 생각된다. 이로써, 茵陳蒿湯이 간암 치료에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 보여지며, 앞으로 茵陳蒿湯이 영향을 미치는 세포내 분자적 기작에 관한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이고, in vivo 실험들도 함께 이루어져야 할 것이다.

## 결론

인진, 치자, 대황으로 구성된 茵陳蒿湯이 사람 간암 세포주인 HepG2의 세포사멸 유도과 그 기전에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 茵陳蒿湯이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 XTT assay와 trypan blue exclusion assay를 수행한 결과, 24시간 처리시 0.5 mg/ml의 농도까지 Chang의 세포 생존율에는 거의 영향이 없었고, HepG2의 경우 농도 의존적으로 세포생존율이 감소되었다. 현미경을 이용한 세포 형태학적 변화를 통해서도 농도 의존적인 세포사가 유도되었다.
2. 茵陳蒿湯에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 수행한 바, 농도 의존적으로 procaspase-3, -8, -9의 발현이 감소와 PARP의 cleavage가 관찰되었다.
3. 茵陳蒿湯이 mitochondrial pathway에 관여하는 Bcl-2 family와 cytochrome c의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 농도가 증가함에 따라 mitochondria에서 세포질로 방출되는 cytochrome c의 양이 증가하였고, anti-apoptotic Bcl-2의 발현 감소와 pro-apoptotic Bax의 발현이 증가되었다.
4. 茵陳蒿湯 처리시 MAP kinase의 활성화에 어떠한 변화가 있는지 알아보기 위하여 anti-P-ERK1/2와 anti-P-p38을 이용한 western blot을 수행하였다. 그 결과, 처리한 茵陳蒿湯의 농도에 의존적으로 P-ERK1/2의 감소와 P-p38 MAP kinase의 증가가 관찰되었다.
5. MAP kinases의 활성 변화는 HepG2의 세포

사멸 유도과 관련이 있을 것으로 생각되었다. 이에 각각의 MAP kinase의 activator 또는 inhibitor를 처리한 후 HepG2 세포의 생존을 변화와 세포사멸에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. ERK1/2의 activator와 p38 MAP kinase를 처리하였을 때茵陳蒿湯에 의해 유도되는 apoptosis가 감소하였고 세포 생존율의 감소도 저해되었다.

6.茵陳蒿湯이 Ras/Raf/ERK pathway에 어떠한 영향을 주는 지 알아 본 바, 농도 의존적으로 Raf와 ERK 활성이 감소되었다.

결론적으로,茵陳蒿湯은 사람 간암 세포주인 HepG2의 세포 생존율을 감소시키고, mitochondrial pathway를 통한 apoptosis를 유도할 수 있으며, MAP kinase의 활성을 조절함으로써 apoptosis에 영향을 줄 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임.

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음 (과제번호:R13-2005-013-01000-0).

본 연구는 2005학년도 동국대학교 연구년 지원에 의하여 이루어졌음.

## 참고문헌

- 張仲經. 仲經全書, 서울, 대성문화사. p409, 494, 611, 1984.
- 沈金鰲. 中醫對肝炎, 간경화적 변증론치, 중국, 산서인민위생출판사. pp30-33, 1983.
- 宗全和. 中醫方劑通釋 권1, 중국, 하북과학기술출판사. pp215-219, 1995.
- 박영순. 한방의 약리해설, 서울, 아카데미서적. p125, 153, 165, 2002.
- 정승식, 최승훈, 안규석.茵陳蒿湯 및茵陳蒿湯가미방이 생쥐의 담석증모형에 미치는 영향. 한국, 동의병리학회지. 6권 pp159-170, 1991.
- 김성동.茵陳蒿湯이 손상간 및 고지혈증에 미치는 영향. 한국, 대전대학교 대학원, 석사학위논문, 1992.
- 이승우.茵陳蒿湯의 약침과 경구투여가 손상간에 미치는 영향의 비교연구. 한국, 대한침구학회지. 1999;16(1).
- 배오성. 풍한습주치처방의 항균력검색과茵陳蒿湯 항균효능 및 성분 관련 연구. 서울, 경희대학교대학원, 박사학위논문. 1998.
- 최재우, 배창욱, 박소영, 윤현정, 박선동.茵陳蒿湯의 조합에 따른 간보호효과. 대한방제학회지. 2005;13(1):9-33.
- Yamamoto M, Ogawa K, Morita M, Fukuda K, Komatsu Y. The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. Hepatology. 23(3):552-559, 1996.
- Yamashiki M, Mase A, Arai I, Huang XX, Nobori T, Nishimura A, Sakaguchi S, Inoue K. Effects of the Japanese herbal medicine 'Inchinko-to' (TJ-135) on concanavalin A-induced hepatitis in mice. Clin Sci (Lond). 99(5):421-431, 2000.
- Iinuma Y, Kubota M, Yagi M, Kanada S, Yamazaki S, Kinoshita Y. Effects of the herbal medicine Inchinko-to on liver function in postoperative patients with biliary atresia-a pilot study. J Pediatr Surg. 38(11):1607-1611, 2003.
- Inao M, Mochida S, Matsui A, Eguchi Y, Yulutuz Y, Wang Y, Naiki K, Kakinuma T, Fujimori K, Nagoshi S, Fujiwara K. Japanese herbal medicine Inchin-ko-to as a therapeutic drug for liver fibrosis. J Hepatol. 41:584-591, 2004.
- Sakagami Y, Mizoguchi Y, Miyajima K. Effects of the Chinese prescription 'Inchinko-to' on intrahepatic cholestasis induced by the cholestatic factor. Jpn J Gastroenterol. 82(10):2608-2612, 1985.
- Onji M, Kikuchi T, Michitaka K, Yamashita K, Ohta Y. Combined use of ursodeoxycholic acid and Inchinko-to in jaundice patients with primary biliary cirrhosis. J Med Pharm. Soc. 7:161-167, 1990.
- Itoh T, Shibahara N, Mantani N, Tahara E, Shimada Y. and Terasawa, K. Effect of Kampo treatment on chronic viral hepatitis on the basis of traditional diagnosis. J Trad Med. 14:204-210, 1997.

17. 김상찬 외. 방제학, 서울, 영림사, p491, 1999.
18. 정옥삼. 달원음의 항산화 및 간세포보호효과. 한국, 원광대학교대학원, 2003.
19. 김영복. 茵陳蒿湯과 오수모과당의 항산화 및 간세포보호효과. 한국, 원광대학교대학원 박사학위논문, 2003.
20. 조기호. 한방처방의 동서의학적 해석방법론, 한국, 도서출판 고려의학, pp419-421, 1999.
21. 김호철. 한약약리학, 서울, 집문당, pp239-241, 125-127, 174-177, 2004.
22. 한창우, 김영철, 이장훈, 우홍정. 청간해주탕이 kupffer cell의 NFkB활성화 및 세포사멸에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 25(1):59-70, 2004.
23. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕가미방이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지. 19(1):145-164, 1998.
24. 표임정, 이장훈, 우홍정. 인진사령산이 간세포활성, 세포주기 및 Fas -mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 22(1):119-140, 1999.
25. 강우성, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕이 HepG2 cell의 TNF- $\alpha$  신호전달계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 25(1):28-45, 2004.
26. 김재용. 생간건비탕이 HepG2 cell의 증식, 세포사멸 및 활성조절 신호전달계에 미치는 영향. 서울, 경희대학교대학원박사학위논문, 2006.
27. 이지현, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 인체간세포의 TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 20(1):53-61, 2000.
28. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. Cell Death Differ. Aug;13(8):1396-1402, 2006.
29. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. Adv Cancer Res. Aug;94(1):143-196, 2005.
30. Xi L., Chen G., Zhou J., Xu G., Wang S., Wu P., Zhu T., Zhang A., Ma D. Inhibition of telomerase enhances apoptosis induced by sodium butylate via mitochondrial pathway. Apoptosis. 11(5):789-798, 2006.
31. Dong C, Dayis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. Annu Rev Immunol. Oct;20(2):55-72, 2002.
32. Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. Carcinogenesis. May;25(5):647-659, 2004.
33. Huang Q, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Li LH, Ikejima T. Silymarin augments human cervical cancer HeLa cell apoptosis via P38/JNK MAPK pathways in serum-free medium. J Asian Nat Prod Res. Oct;7(5):701-709, 2005.