대한한의학회지 제22권 제3호(2001년 9월)
J Korean Oriental Med 2001;22(3):141-155

원 저

# 茵陳이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향

신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

## Effect of *Injin* Fraction on Hepatic Fibrosis induced by TGF-β1

Sang-Man Shin, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo
Department of Internal Medicine, Oriental Medicine, Kyunghee University

**Objective :** The aim of this study is to investigate the effect of *Injin* fractions on hepatic fibrosis induced by TGF- 1.
**Method :** TGF-β1 mRNA, protein, TGF-β1 receptor, Smad family and PAI-1 mRNA were studied in HepG2 cell, and the proliferation, connective tissue growth factor, fibronectin and collagen type I mRNA in T3891 fibroblast by quantitative RT-PCR, ELISA and thymidine incorporation assay.
**Results :** On TGF-β1 mRNA and protein synthesis in HepG2, $H_2O$, butanol and hexane fractions of *Injin* showed inhibitory effect in a dose-dependent way. In the study on TGF-β1 receptor, Smad family and PAI-1 mRNA in HepG2, $H_2O$, butanol and hexane fraction of *Injin* showed inhibitory effect on the expression of PAI-1 in a dose-dependent way. On the proliferation of T3891 fibroblast induced by TGF-β1, $H_2O$, ethylacetate and butanol fractions of *Injin* showed inhibitory effect. In the study on the factors affected by TGF-β1, $H_2O$, ethylacetate and butanol fractions of *Injin* showed inhibitory effect on CTGF, and $H_2O$, butanol, chloroform and hexane fractions showed inhibitory effect on the expression of collagen type I , whereas no fraction showed inhibitory effect on the expression of fibronectin
**Conclusion :** These results show that each fraction of *Injin* acts as a fibrosis inhibitory factor by itself or in combination, ultimately inhibiting liver cirrhosis. *(J Korean Oriental Med 2001;22(3):141-155)*

***Key Words:*** *Injin* fraction, TGF-β1, hepatic fibrosis, HepG2, fibroblast

## 서 론

우리나라 인구의 약 6~7%가 보유자 내지는 만성 간염형태로 B형 간염 바이러스에 감염되어 있으며[1], 만성C형 간염의 anti-HCV (C형 간염 바이러스 항체) 양성률은 0.03%~1.49%로 보고되고 있다[2]. 간염이 만성화됨에 따라 간세포의 괴사, 재생이라는 과정을 반복하여 간섬유화가 일어나고 간경변으로 진행하는 양상을 지닌다.

한의학에서 간질환에 대한 내용은 黃疸, 脹滿, 積聚, 鼓脹, 酒傷 등에 수록되어 있으며[3], 특히 黃疸은 바이러스성 간염, 간경변증 등에 임상적으로 적용되고 있다. 黃疸의 주된 원인은 濕熱이며, 茵陳은 濕熱을 제거하는 淸熱利濕의 대표적인 약물로서[4,5], 유전

· 접수 : 2001년 7월 1일 · 채택 : 7월 30일
· 교신저자 : 이장훈, 경희의료원 한방병원 1내과, 서울시 동대문구 회기동 1번지
(Tel. 02-958-9118, Fax. 02-958-9120, E-mail: komclive@khmc.or.kr)

자 조절을 통해 apoptosis를 억제하여 간염의 치료에 유용한 것으로 알려져 있다.

茵陳을 君藥으로하는 한약의 간보호효과에 대한 연구로서 禹[5]는 茵蔯清肝湯이 만성 B형 간염 환자에서 AST, ALT 등의 혈청학적 개선과 HBeAg의 음전 효과가 있음을 보고하였고, 李[9]는 茵陳을 주재로 한 수종의 처방이 실험적 간손상에 대해 간보호작용과 이담작용 및 지질강하작용 등의 효능이 있음을 보고하였다. 또한 姜[10]은 茵陳清肝湯이 마우스 간염바이러스와 수침 스트레스로 유발한 마우스의 간경변증에 있어 간기능개선 및 간손상회복에 유의한 효과가 있음을 보고하였다. 최근에 한약의 효능에 대한 분자생물학적 접근이 시도되고 있는데, 朴[11]은 茵陳清肝湯加味方이 Bcl-2, Bcl-xL 활성을 높여 세포사망을 억제한다고 보고하였고, 洪[12]과 高[13]는 각각 茵陳清肝湯加味方과 茵蔯四 散분획물이 간세포를 보호하고 Cpp32 protease, Fas를 억제하고 Bcl-2를 활성화시켜 apoptosis를 억제한다고 보고하였다. 李[14]는 茵陳의 분획물 중 butanol fraction에서 Fas를 매개로 하는 apoptosis에 대해 간세포 보호효과가 가장 높다고 하였으며, 李[15]는 茵陳의 butanol fraction은 간세포의 TGF-$\beta$1 induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 세포손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효능을 나타낸다고 보고하였다.

이에 저자는 본 실험에서 茵陳이 섬유화 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 茵陳을 Hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, $H_2O$의 5가지 용매로 분획하고, 그 각 분획을 HepG2 cell에 처리하여 TGF-$\beta$1 mRNA, protein 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 섬유아세포를 이용하여 TGF-$\beta$1에 의하여 조절되는 것으로 알려진 간섬유화 관련 인자들 즉, fibroblast 증식도, connective tissue growth factor (CTGF), fibronectin, collagen type I$\alpha$ 등의 mRNA 발현 증가여부를 분석하여, 茵陳의 TGF-$\beta$1 유도성 간섬유화 억제 효과에 대한 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전외한약규격주해[16]에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

| Drug | Pharmacognosy Name | Scientific Name | Dose |
|---|---|---|---|
| 茵陳 | *Artemisiae Capillaris Herba* | *Artemisia capillaris* Thunb. | 615g |

#### 2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료 615g을 3차 증류수 4.8 *l* 로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 70.6g의 건조추출물을 얻어 11.48%의 수율을 보였다.

### 2. 방법

#### 1) 유기용매를 이용한 인진성분의 추출

위에서 얻은 인진 중 30g을 이용하여, 1차 추출용매인 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, H2O의 5가지 용매에 녹였다. 그 방법은 우선 sample 30g을 증류수 300*ml*에 녹인다. 그 후 hexane 200*ml*를 넣어, 섞고 분리한다. 상층액을 모아 hexane을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 hexane fraction을 얻는다. 물층에 chloroform 200*ml*을 넣고 분리한다. 하층을 모아 chlorofrom을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 chloroform fraction을 얻는다. 다시 물층에 ethylacetate 200*ml*를 넣어 분리한다. 상층액을 모아 ethylacetate를 날린다. 남은 부분을 모아 동결건조하여 ethylacetate fraction을 얻는다. 다시 물층에 butanol fraction 200*ml*를 넣어 분리한다. 상층액을 모아 butanol을 날린다. 남은 부분을 동결건조하여 butanol fraction을 얻는다.

| 1차 추출용매 | 수득량(g) |
|---|---|
| Hexane | 0.11 |
| Chloroform | 2.84 |
| Ethylacetate | 2.01 |
| Butanol | 1.25 |
| $H_2O$ | 20.64 |

위에서 얻은 각각의 약물을 2차 추출용매인 DMSO, chloroform, butanol, $H_2O$를 이용하여 다시 녹여서 100㎎/㎖의 농도로 stock solution을 제작하였다.

2) 간세포와 섬유아세포에 대한 약물처리

우선 인진분획이 인체 간세포주 HepG2의 TGF-β1 mRNA와 protein 및 신호전달기전관련 유전자에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 간세포주에 처리되는 약물의 최종농도는 1, 10, 50, 100㎍/㎖로 하였고 48시간이 경과한 후 배양액 상청을 취하여 ELISA법으로 protein을 정량하였고, 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 RNA를 추출하였다. TGF-β1이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향과 TGF-β1에 의해 그 발현이 촉진되는 CTGF, fibronectin, collagen type Iα 유전자의 mRNA 발현에 미치는 인진분획물의 영향을 분석하기 위하여 T3891 fibroblast에 인진 각 분획의 농도를 1, 10, 50, 100㎍/㎖로 4시간 처리하고 TGF-β1 (2ng/㎖)을 24시간, 48시간 처리하였다.

## 실 험

1. 정량 RT-PCR

1) RNA의 추출

① GSS solution의 제작

250g의 guanidine isothiocyanate을 293㎖의 3차 증류수에 넣은 후 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6㎖와 10% sarkosyl 26.4㎖를 넣어 65℃에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다.

② Solution D의 제작

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 넣어 제작하였다.

③ $10^7$개의 세포에 solution D 500㎕, 2M sodium acetate(pH4.0) 50㎕를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500㎕, chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 100㎕를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

④ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000㎕를 넣어 -70℃에서 24시간 침전시켰다.

⑤ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA pellete을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30㎕의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

2) cDNA의 제작

① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

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

② 혼합용액이 20㎕가 되도록 sterile water를 첨가한 후 42℃에서 15분간 방치하였다.

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

3) Primer의 제작

① House keeping gene

Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase : GAPDH

② Target genes

TGF-β1, TGF-β type I receptor, TGF-β type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1), Connective tissue growth factor(CTGF), Fibronectin, Collagen type Iα

4) Quantitative PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10x amplification buffer 10㎕, Mixture of dNTP (10 pM) 5㎕, GAPDH primer 1 (10 pM) 2㎕, GAPDH primer 2 (10 pM) 2㎕, Template cDNA 4㎕, $H_2O$ 77㎕

② GAPDH primer를 이용하여 다음의 조건으로 36 cycles PCR반응을 시행하였다.

a. First cycle

Denaturation 5 min at 94℃

| | |
|---|---|
| Annealing | 1 min at 59℃ |
| Polymerization | 1 min at 72℃ |

b. Subsequent cycle (2-35 cycles)

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

c. Last cycle

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

③ PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 정량화하였다.

④ 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 ±20%내로 정량화 하였다.

⑤ 위의 결과를 바탕으로 target 유전자에 대한 PCR 반응을 시행하여 상대적인 정량화를 시행하였다. Target gene의 PCR은 같은 조건에서 36cycle을 시행하였다.

### 2. TGF-β1 ELISA

인진분획물이 인체 간세포주 HepG2의 TGF-β1 단백질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA 시스템(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)을 사용하여 TGF-β1 단백질을 정량분석하였다. HepG2 세포를 $1\times10^4$cells/well로 분주하고 RPMI 배지에 각각의 인진 분획물 1, 10, 50, 100 μg/ml를 처리하여 48시간 배양 후, 상청을 수집하여 biotin conjugated human TGF-β1 항체 50μl과 검액 50μl 혼합액, Kit에 제공된 standard TGF-β1 50μl와 biotin conjugated human TGF-β1 항체 50μl 혼합액을 각각 human TGF-β 항체가 코팅된 플레이트에 넣고 상온에서 2시간 incubation한 후, horseradish peroxidase conjugated streptavidin을 tetramethyl benzidine(TMB) 기질과 함께 첨가하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

| Gene | Nucleotide sequences |
|---|---|
| GAPDH | (Sense 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3') |
| | (Antisense 5'-GACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3') |
| TGF-β1 | (Sense 5'-CACTTGCAGGAGCGCACGATCATG-3') |
| | (Antisense 5'-TTTCCTGCTTCTCATGGCCACCCC-3') |
| TβR-I | (Sense 5'-GTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT-3') |
| | (Antisense 5'-CCTGAGGCAGAACCTGACGTTGTCA-3') |
| TβR-II | (Sense 5'-GAAGGCGCCGTCCGTGCGCT-3') |
| | (Antisense 5'-AAGTCAGGATTGCTGGTGTTATAT-3') |
| Smad2 | (Sense 5'-GAGGTTCGATACAAGAGGCTGT-3') |
| | (Antisense 5'-GCCTTGAGTTCATGATGACTGT-3) |
| Smad3 | (Sense 5'-GGACGACTACAGCCATTCCA-3') |
| | (Antisense 5'-TTCCGATGTGTCTCCGTGTCAG-3') |
| Smad4 | (Sense 5'-GCTTCAGAAATTGGAGACAT-3') |
| | (Antisense 5'-GATGCACGATTACTTGGTGG-3') |
| PAI-1 | (Sense 5'-CTTGTCTTTGGTGAAGGGTCTGCT-3') |
| | (Antisense 5'-TGTGTCTTCACCCAGTCATTGATG-3') |
| CTGF | (Sense 5'-AACCGTGGTTGGGCCTGCCCTC-3') |
| | (Antisense 5'-GTATGTCTTCATGCTGGTGCAG-3') |
| Fibronectin | (Sense 5'-GGCCACTGTGTCACAGACAGTG-3') |
| | (Antisense 5'-TGTGACCCATGTCATGCTGTGCTT-3') |
| Collagen Iα | (Sense 5'-AGCAGACGGGAGTTTCTCCTCG-3') |
| | (Antisense 5'-ACCTTGCCGTTGTCGCAGACGC-3) |

### 3. [$^3$H]Thymidine Incorporation Assay를 이용한 세포증식분석

세포의 DNA 복제에 미치는 약물의 영향을 조사하기 위하여 [$^3$H]Thymidine incorporation assay를 시행하였다. T3891 세포를 $2\times10^4$ cells/well로 24-well multiplates에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 TGF-β1 2 ng/ml을 처리하였다. 약물처리 20시간 후에 1.0 Ci/ml의 [$^3$H]thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)를 4시간 동안 pulse-labeling 하였고, DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다. TGF-β1에 의하여 촉진되는 세포증식에 미치는 인진분획물의 영향을 조사하기 위하여 각각의 분획물 (1, 10, 50, 100㎍/ml)을 TGF-β1 투여 4시간 전에 세포에 처리하였으며 세포증식의 변화유무를 대조군과 비교분석하였다.

## 성 적

### 1. 인진분획물이 HepG2의 TGF-β1 mRNA 합성에 미치는 영향

인진분획물이 인체 간세포주 HepG2의 TGF-β1 mRNA 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 $5\times10^5$cells/well에 각각의 인진 분획물 1, 10, 50, 100 ㎍/ml를 48시간 처리한 후, quantitative RT-PCR법으로 TGF-β1/GAPDH 비율을 분석한 결과는 Table 1, Fig. 1과 같다. H2O, butanol, hexane 분획물 처리군에서 순서대로 약물의 농도 의존적인 TGF-β1 mRNA 발현양의 감소가 관찰되었다.

### 2. 인진분획물이 HepG2의 TGF-β1 단백질 생성에 미치는 영향

인진분획물이 인체 간세포주 HepG2의 TGF-β1 단백질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 1 $\times10^4$cells/well에 각각의 인진 분획물 1, 10, 50, 100

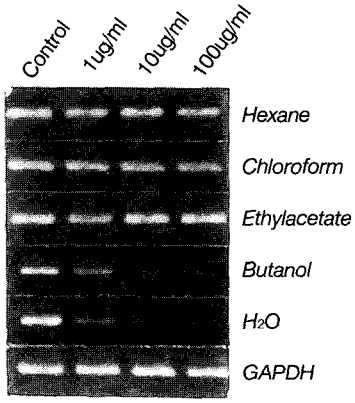


**Fig. 1.** Quantitative RT-PCR analysis of TGF-β1 expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions.
10㎕ of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

**Table 1.** Effect of *Injin* Fractions on TGF-β1 mRNA Expression

| | Control | Treated(㎍/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 1.04 | 0.92 | 0.84 | 0.74 |
| | 1.00 | 0.96 | 0.91 | 0.86 | 0.72 |
| Chloroform | 1.00 | 0.98 | 0.95 | 0.92 | 0.83 |
| | 1.00 | 1.02 | 0.97 | 0.94 | 0.84 |
| Ethylacetate | 1.00 | 1.03 | 0.98 | 1.02 | 0.94 |
| | 1.00 | 1.05 | 1.02 | 0.97 | 0.91 |
| Butanol | 1.00 | 0.97 | 0.86 | 0.71 | 0.61 |
| | 1.00 | 1.02 | 0.85 | 0.73 | 0.56 |
| H2O | 1.00 | 1.00 | 0.82 | 0.70 | 0.44 |
| | 1.00 | 1.03 | 0.81 | 0.68 | 0.43 |

; Each value represents relative ratio of TGF-β1/GAPGH when that of the control is set to 1.00*.

㎍/ml를 48시간 처리한 후, ELISA법을 이용하여 control의 TGF-β1양을 500으로 정하고 처리군 TGF-β1의 상대값을 산출한 결과는 Table 2와 같다. TGF-β1 mRNA 발현 억제효과와 동일하게 H2O, butanol, hexane 분획물 순으로 약물의 농도 의존적인 TGF-β1 단백질의 생성억제가 관찰되었다.

### 3. 인진분획물이 HepG2의 TGF-β1 신호전달기전 관련 유전자 합성에 미치는 영향

인진분획물이 TGF-β 신호전달기전관련 유전자(TβR-I, TβR-II, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA)의 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 5×10$^5$cells/well에 각각의 인진 분획물 1, 10, 50, 100 ㎍/ml를 48시간 처리한 후, quantitative RT-PCR로 target gene/GAPDH 비율을 분석한 결과는 Table 3-7, Fig. 2-4와 같다. 인진분획물은 TβR-I, TβR-II, Smad2, Smad3, Smad4 각각의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

1) TβR-I Expression (Table 3, Fig. 2)
2) TβR-II Expression (Table 4, Fig. 3)
3) Smad2 Expression (Table 5, Fig. 4)
4) Smad3 Expression (Table 6)
5) Smad4 Expression (Table 7)

### 4. 인진분획물이 PAI-1 mRNA 합성에 미치는 영향

인진의 TGF-β1 합성억제에 대한 검증을 위해 TGF-β1의 target gene인 PAI-1 mRNA 합성에 미치는 영향을 조사하였다. HepG2 5×10$^5$cells/well에 각각의 인진 분획물 1, 10, 50, 100 ㎍/ml를 48시간 처리한 후 quantitative RT-PCR로 PAI-1/GAPDH 비율을 분석한

**Table 2.** Effect of *Injin* Fractions on TGF-β1 Protein Expression

| | Control | Treated(㎍/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 500* | 499 | 496 | 482 | 462 |
| | 500 | 505 | 501 | 480 | 464 |
| Chloroform | 500 | 512 | 505 | 501 | 492 |
| | 500 | 505 | 498 | 493 | 498 |
| Ethylacetate | 500 | 498 | 497 | 492 | 495 |
| | 500 | 504 | 502 | 495 | 490 |
| Butanol | 500 | 507 | 496 | 462 | 430 |
| | 500 | 498 | 492 | 459 | 432 |
| H2O | 500 | 506 | 488 | 447 | 406 |
| | 500 | 503 | 474 | 451 | 401 |

; Each value represents relative volume of TGF-β1 of experimental groups when that of the control is set to 500*.

**Table 3.** Effect of *Injin* Fractions on TβR-I mRNA Expression

| | Control | Treated(㎍/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 0.92 | 0.98 | 1.05 | 0.99 |
| | 1.00 | 1.01 | 1.00 | 1.05 | 1.06 |
| Chloroform | 1.00 | 0.95 | 1.05 | 0.97 | 0.94 |
| | 1.00 | 1.01 | 1.01 | 0.99 | 1.03 |
| Ethylacetate | 1.00 | 0.98 | 0.94 | 0.94 | 0.98 |
| | 1.00 | 0.95 | 0.97 | 0.96 | 1.01 |
| Butanol | 1.00 | 1.04 | 1.06 | 1.07 | 1.05 |
| | 1.00 | 0.99 | 1.03 | 0.99 | 0.96 |
| H2O | 1.00 | 1.02 | 1.04 | 1.06 | 0.96 |
| | 1.00 | 0.97 | 0.98 | 1.03 | 1.04 |

: Each value represents relative ratio of TβR-I/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

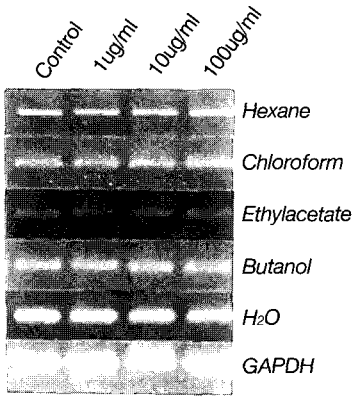


**Fig. 2.** Quantitative RT-PCR analysis of TβR-I expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions.
10㎕ of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

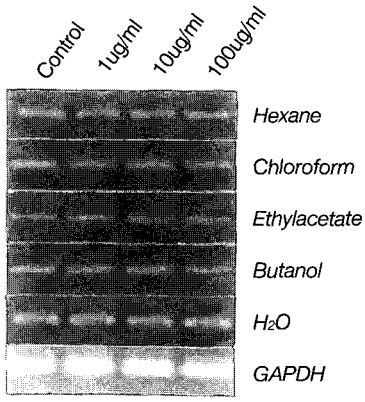


**Fig. 3.** Quantitative RT-PCR analysis of TβR-II expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions.
10㎕ of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

**Table 4.** Effect of *Injin* Fractions on TβR-II mRNA Expression

| | Control | Treated(㎍/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 1.00 | 1.02 | 0.95 | 1.03 |
| | 1.00 | 0.93 | 1.04 | 1.03 | 1.00 |
| Chloroform | 1.00 | 0.99 | 0.97 | 1.03 | 1.02 |
| | 1.00 | 0.95 | 0.99 | 1.00 | 0.94 |
| Ethylacetate | 1.00 | 0.93 | 1.05 | 0.95 | 0.98 |
| | 1.00 | 0.97 | 1.01 | 0.99 | 1.03 |
| Butanol | 1.00 | 0.96 | 0.96 | 1.02 | 0.99 |
| | 1.00 | 0.98 | 1.03 | 1.00 | 1.04 |
| H2O | 1.00 | 0.96 | 1.03 | 0.97 | 1.03 |
| | 1.00 | 1.00 | 0.98 | 0.99 | 0.97 |

; Each value represents relative ratio of TβR-II/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

결과는 Table 8, Fig. 5와 같다. 인진분획물에 의한 TGF-β1 발현 억제와 동일한 양상으로 TGF-β1에 의해 그 발현이 유도되는 대표적인 TGF-β1 target gene인 PAI-1 의 발현이 H20, butanol, hexane 분획순으로 농도 의존적으로 감소됨이 관찰되었다.(Table 8, Fig. 5)

### 5. 인진분획물이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향

인진분획물이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 T3891 human fetal lung fibroblast $2\times10^4$cells/well에 인진분획물 1, 10, 50, 100 ㎍/ml를 4시간 동안 처리한 후, TGF-β1 2 ng/ml을 20시간 처리하고 1.0 Ci/ml의 [$^3$H]thymidine을 4시간 동안 pulse-labeling하여 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양을 liquid scintillation counter를 이용하여 측정한 결과는 Table 9와 같이 나타났다. 인진분획물의 투여로 TGF-β1에 의해 유도되는 fibroblast 세포증식 촉진에 대한

**Table 5.** Effect of *Injin* Fractions on Smad2 mRNA Expression

| | Control | Treated(㎍/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 0.96 | 1.02 | 1.02 | 0.96 |
| | 1.00 | 0.92 | 1.01 | 0.95 | 1.03 |
| Chloroform | 1.00 | 0.95 | 0.98 | 0.98 | 1.03 |
| | 1.00 | 0.93 | 0.95 | 0.96 | 0.96 |
| Ethylacetate | 1.00 | 1.01 | 1.05 | 0.99 | 0.95 |
| | 1.00 | 0.99 | 0.96 | 0.95 | 0.99 |
| Butanol | 1.00 | 1.05 | 0.96 | 1.01 | 1.01 |
| | 1.00 | 1.01 | 1.05 | 1.06 | 0.97 |
| $H_2O$ | 1.00 | 1.03 | 1.04 | 1.04 | 0.99 |
| | 1.00 | 1.05 | 1.01 | 1.03 | 0.97 |

; Each value represents relative ratio of Smad2/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

**Table 6.** Effect of *Injin* Fractions on Smad3 mRNA Expression

| | Control | Treated(㎍/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 0.95 | 0.94 | 0.98 | 0.92 |
| | 1.00 | 0.99 | 0.98 | 0.94 | 0.98 |
| Chloroform | 1.00 | 1.10 | 1.05 | 1.01 | 1.02 |
| | 1.00 | 1.01 | 0.99 | 0.99 | 0.97 |
| Ethylacetate | 1.00 | 0.97 | 1.02 | 1.04 | 0.98 |
| | 1.00 | 0.99 | 1.06 | 1.00 | 1.03 |
| Butanol | 1.00 | 1.07 | 1.01 | 0.97 | 1.04 |
| | 1.00 | 1.01 | 0.96 | 0.99 | 1.06 |
| $H_2O$ | 1.00 | 1.02 | 0.97 | 1.00 | 1.05 |
| | 1.00 | 0.97 | 1.02 | 0.96 | 0.98 |

; Each value represents relative ratio of Smad3/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

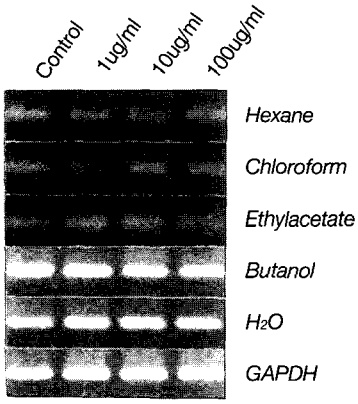


**Fig. 4.** Quantitative RT-PCR analysis of Smad2 expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions.
10㎕ of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

억제작용이 H20, ethylacetate, butanol의 순으로 농도 의존적으로 관찰되었다.(Table 9)

### 6. 인진분획물이 CTGF, fibronectin, collagen type Iα mRNA 발현에 미치는 영향

TGF-β1에 의해 그 발현이 촉진되는 CTGF, fibronectin, collagen type Iα mRNA 발현에 미치는 인진분획물의 영향을 조사하기 위해 T3891 human fetal lung fibroblast $5 \times 10^5$cells/well에 각각의 인진 분획물 1, 10, 50, 100 ㎍/ml를 4시간 동안 처리하고 TGF-β1 2 ng/ml를 44 시간 처리한 후, quantitative RT-PCR로 target gene/GAPDH 비율을 분석한 결과는 Table 10-12, Fig. 6-8과 같이 나타났다. Fibroblast 증식억제와 CTGF 발현억제와의 강한 상관성이 관찰되었으며, fibronectin 발현에 있어서는 모든 분획물의 100 ㎍/ml

**Table 7.** Effect of *Injin* Fractions on Smad4 mRNA Expression

| | Control | Treated(μg/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 0.99 | 1.02 | 0.89 | 1.04 |
| | 1.00 | 0.97 | 0.99 | 1.00 | 0.99 |
| Chloroform | 1.00 | 1.06 | 1.04 | 0.96 | 1.04 |
| | 1.00 | 1.01 | 1.04 | 0.98 | 1.00 |
| Ethylacetate | 1.00 | 0.93 | 1.07 | 0.95 | 1.01 |
| | 1.00 | 1.01 | 1.05 | 1.04 | 0.96 |
| Butanol | 1.00 | 0.94 | 0.98 | 1.01 | 0.94 |
| | 1.00 | 0.98 | 1.04 | 0.98 | 0.96 |
| $H_2O$ | 1.00 | 0.98 | 1.02 | 0.98 | 1.02 |
| | 1.00 | 1.05 | 0.97 | 0.98 | 1.00 |

; Each value represents relative ratio of Smad4/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

**Table 8.** Effect of *Injin* Fractions on PAI-1 mRNA Expression

| | Control | Treated(μg/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 1.01 | 0.87 | 0.76 | 0.62 |
| | 1.00 | 1.06 | 0.83 | 0.71 | 0.66 |
| Chloroform | 1.00 | 1.01 | 0.94 | 1.03 | 0.95 |
| | 1.00 | 1.02 | 0.91 | 0.96 | 1.07 |
| Ethylacetate | 1.00 | 0.98 | 1.00 | 0.94 | 0.98 |
| | 1.00 | 1.01 | 1.03 | 0.99 | 1.03 |
| Butanol | 1.00 | 0.94 | 0.81 | 0.61 | 0.51 |
| | 1.00 | 1.00 | 0.77 | 0.60 | 0.49 |
| $H_2O$ | 1.00 | 1.02 | 0.73 | 0.62 | 0.40 |
| | 1.00 | 0.96 | 0.74 | 0.60 | 0.38 |

; Each value represents relative ratio of PAI-1/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

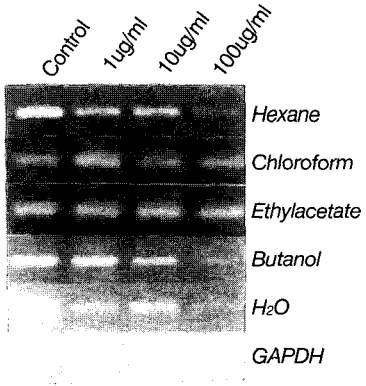


**Fig. 5.** Quantitative RT-PCR analysis of PAI-1 expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions.
10μl of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

투여군에서 다소의 발현감소 양상이 인지되었으나 그 정도는 미미하였다. Collagen type Iα mRNA 발현에 있어서는 ethylacetate 분획을 제외한 모든 분획물에서 $H_2O$, butanol, chloroform, hexane 순으로 감소효과가 농도 의존적으로 관찰되었다.

1) CTGF mRNA expression (Table 10, Fig. 6)
2) Fibronectin mRNA expression (Table 11, Fig. 7)
3) Collagen type Iα mRNA expression (Table 12, Fig. 8)

## 고 찰

우리나라의 경우 간염 바이러스, 특히 B형간염 바이러스에 의한 만성간질환의 이환율이 세계적으로 높은 편이고, 사회적으로 중요한 역할을 담당할 40대

**Table 9.** Effect of TGF-β1 and the Combinatons of TGF-β1 and *Injin* Fractions on T3891 Fibroblast Proliferation

| | Cont-rol | TGF-β1(2ng/ml) | TGF-β1 + *Injin* fraction(μg/ml; 28 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 100* | 285 | 281 | 275 | 271 | 275 |
| | 100 | 259 | 262 | 258 | 249 | 243 |
| Chloroform | 100 | 285 | 277 | 279 | 269 | 262 |
| | 100 | 259 | 266 | 261 | 262 | 245 |
| Ethylacetate | 100 | 285 | 287 | 240 | 202 | 174 |
| | 100 | 259 | 251 | 233 | 194 | 158 |
| Butanol | 100 | 285 | 283 | 258 | 231 | 218 |
| | 100 | 259 | 265 | 239 | 219 | 180 |
| H2O | 100 | 285 | 280 | 244 | 198 | 168 |
| | 100 | 259 | 267 | 221 | 194 | 146 |

; Each value represents incorporated radioactivity of [$^3$H]thymidine when that of the control is set to 100*.

**Table 10.** Effect of *Injin* Fractions on CTGF mRNA Expression

| | Control | TGF-β1(2ng/ml) | TGF-β1 + *Injin* fraction(μg/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 1.96 | 2.02 | 1.88 | 1.90 | 1.98 |
| | 1.00 | 2.05 | 2.06 | 1.98 | 1.96 | 1.94 |
| Chloroform | 1.00 | 1.96 | 2.01 | 2.06 | 1.99 | 1.95 |
| | 1.00 | 2.05 | 1.99 | 1.88 | 1.89 | 1.86 |
| Ethylacetate | 1.00 | 1.96 | 2.04 | 1.80 | 1.61 | 1.12 |
| | 1.00 | 2.05 | 1.98 | 1.69 | 1.44 | 1.11 |
| Butanol | 1.00 | 1.96 | 1.93 | 1.82 | 1.72 | 1.37 |
| | 1.00 | 2.05 | 2.01 | 1.88 | 1.62 | 1.26 |
| H2O | 1.00 | 1.96 | 1.78 | 1.61 | 1.40 | 1.02 |
| | 1.00 | 2.05 | 1.86 | 1.73 | 1.52 | 0.88 |

; Each value represents relative ratio of CTGF/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

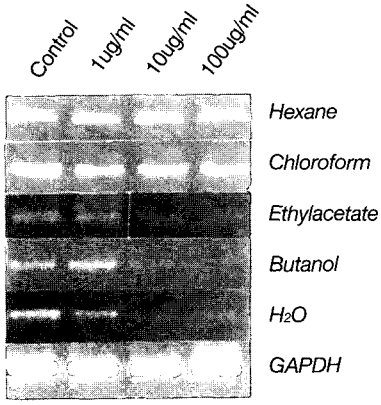


**Fig. 6.** QuantitativeRT-PCR analysis of CTGF expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions.
10μl of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

에서 간질환으로 인한 사망률이 가장 높게 나타나 개인은 물론 국가적으로도 중요한 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 질환의 중요한 원인이 되는 바이러스성 간질환 및 만성 간질환에 대한 보다 효율적인 치료대책이 시급한 실정이다.

간경변의 생성 기전을 살펴보면, 간세포의 파괴로 괴사된 간세포주변에 새로운 섬유아세포(fibroblast)가 나타나 처음에는 가역적인 섬유화를 일으키다가 지속적으로 반복되는 가운데 비가역적인 콜라겐형성에 이르게 된다[17]. 간경변증에서 콜라겐 생성은 섬유아세포의 콜라겐 생성 증가와 기타 콜라겐 생성 세포수 증가의 결과로 나타난다[6,7].

간세포의 괴사는 간질환에서 흔히 관찰되는 소견이며 간세포의 괴사 정도에 따라 임상증상과 예후가 차이가 날 수 있다. 또 이러한 간괴사의 유형이 간질

**Table 11.** Effect of *Injin* Fractions on Fibronectin mRNA Expression

| | Control | TGF-β1(2ng/ml) | TGF-β1 + *Injin* fraction(μg/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 1.52 | 1.48 | 1.50 | 1.49 | 1.38 |
| | 1.00 | 1.49 | 1.51 | 1.48 | 1.47 | 1.41 |
| Chloroform | 1.00 | 1.52 | 1.55 | 1.49 | 1.49 | 1.39 |
| | 1.00 | 1.49 | 1.52 | 1.53 | 1.56 | 1.40 |
| Ethylacetate | 1.00 | 1.52 | 1.48 | 1.58 | 1.51 | 1.32 |
| | 1.00 | 1.49 | 1.55 | 1.47 | 1.48 | 1.32 |
| Butanol | 1.00 | 1.52 | 1.62 | 1.53 | 1.57 | 1.34 |
| | 1.00 | 1.49 | 1.55 | 1.47 | 1.48 | 1.32 |
| $H_2O$ | 1.00 | 1.52 | 1.58 | 1.50 | 1.49 | 1.33 |
| | 1.00 | 1.49 | 1.56 | 1.53 | 1.50 | 1.32 |

; Each value represents relative ratio of fibronectin/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

**Table 12.** Effect of *Injin* Fractions on Collagen Type Iα mRNA Expression

| | Control | TGF-β1(2ng/ml) | TGF-β1 + *Injin* fraction(μg/ml; 48 hrs) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 10 | 50 | 100 |
| Hexane | 1.00* | 2.30 | 2.22 | 2.11 | 1.88 | 1.62 |
| | 1.00 | 2.18 | 2.19 | 1.99 | 1.80 | 1.52 |
| Chloroform | 1.00 | 2.30 | 2.16 | 2.01 | 2.15 | 2.09 |
| | 1.00 | 2.18 | 2.08 | 2.09 | 1.99 | 2.00 |
| Ethylacetate | 1.00 | 2.30 | 2.15 | 1.97 | 1.72 | 1.39 |
| | 1.00 | 2.18 | 2.08 | 2.09 | 1.99 | 2.00 |
| Butanol | 1.00 | 2.30 | 2.15 | 1.97 | 1.72 | 1.39 |
| | 1.00 | 2.18 | 2.09 | 1.88 | 1.66 | 1.30 |
| $H_2O$ | 1.00 | 2.30 | 2.25 | 1.89 | 1.50 | 1.17 |
| | 1.00 | 2.18 | 2.12 | 1.80 | 1.36 | 1.01 |

; Each value represents relative ratio of collagen type Iα/GAPDH when that of the control is set to 1.00*.

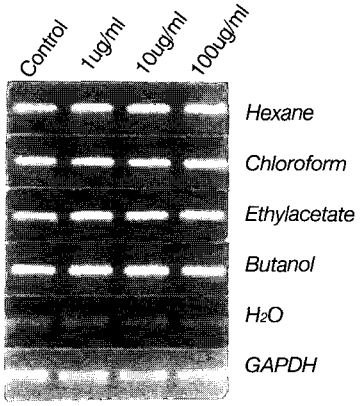


**Fig. 7.** Quantitative RT-PCR analysis of fibronectin expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions. 10μl of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

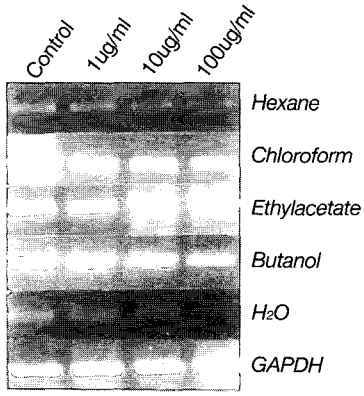


**Fig. 8.** Quantitative RT-PCR analysis of collagen type Iα expression in HepG2 cells treated with *Injin* fractions. 10μl of the PCR products were resolved on a 2% agarose gel and quantitation was achieved by densitometric scanning of band intensities in ethidium bromide-stained gels. Expression of GAPDH was used as an internal standard.

환마다 달라, 국소괴사, 지역괴사, 광범위 괴사 등으로 나눌 수 있다. 괴사부위가 커져 조직의 소실이 많으면 완전 재생은 바랄 수 없게 된다. 괴사의 결과 생긴 조직 결손부는 섬유모세포나 신생 모세혈관을 포함하는 육아조직에 의해서 충전된다. 그 후, 섬유모세포는 계속적으로 콜라겐 섬유의 전구물질을 생산하여, 점차 콜라겐 섬유가 풍부한 반흔(흉터)조직이 형성된다.

세포의 복원과정에서 세포의 이동, 증식, 분화에 세포외 기질이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 세포외 기질에는 콜라겐의 여러 유형, fibronectin, 라미닌이 존재한다[18].

콜라겐은 동물에서 가장 흔한 단백이며 모든 다세포 생물의 세포외기질을 이룬다. 창상치유 과정에서는 섬유모세포에 의해서 콜라겐이 생성되고 축적된다. 정상조직에서 콜라겐의 대사는 생합성과 파괴의 균형을 유지한다.

Fibronectin의 중요한 기능 중 하나는 한 쪽으로 콜라겐, 섬유소, 헤파린 및 proteoglycan 등의 거대분자와 결합하고 다른 한 쪽으로 인테그린 수용체를 통해 세포와 결합하여, 세포의 접착과 퍼짐에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 피부의 창상 치유에서 보면 창상 후 처음 2일 동안에는 혈장에서 유래한 파이브로넥틴이 창상의 기질에 나타나며, 이후에는 내피세포에서 왕성하게 합성된다.

TGF-$\beta$1은 간세포의 콜라겐생성과 세포외 단백물질 생성을 촉진하는 사이토카인이다[17,19]. TGF-$\beta$1은 세포의 형질전환을 촉진하는 인자의 하나로, 세포의 증식, 분화, extracellular matrix의 합성에 관여하고 있다.

최근의 연구에 의하면 TGF-$\beta$1은 fibroblast의 성장과 collagen의 분비를 활성화함으로써 간섬유화를 유도함이 확인되었다. 따라서 TGF-$\beta$1은 간섬유화의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 인자로서 인식되기 시작하였으며, 이의 작용기전에 대한 분자생물학적 연구가 활발하게 진행되고 있다[20]. 또한 TGF-$\beta$1은 Smad라 불리는 세포질내의 매개자를 통하여 그 신호를 세포핵내로 전달하며 최종적으로 target 유전자의 발현을 조절함으로서 기능을 발휘한다[21]. 따라서 TGF-$\beta$1에 의하여 그 발현이 유도 또는 억제되는 유전자를 파악하는 것이 특정 조직에 대한 TGF-$\beta$1의 기능을 이해하는 중요한 단서가 되고 있다. 이후 TGF-$\beta$는 여러 종류의 상피세포의 성장을 촉진시키는 성장인자라기 보다는 강력한 억제인자이고 collagen합성의 강력한 촉진인자이며, T-임파구와 B-임파구 활성의 억제인자이고, monocytes/macrophage의 chemotactic인자이며, 골아세포(osteoblast)의 mitogen으로 작용하는 등 다양한 생리활성을 가지고 있다는 사실이 알려졌다[22].

TGF-$\beta$의 생물학적 작용은 제1형(Type Ⅰ) 및 제2형(Type Ⅱ) receptor에 의해 일어난다. 이들은 모두 transmembrane serine/threonine kinase들로서 heteromeric receptor complex를 형성한다. 최근 TGF-$\beta$/TGF-$\beta$수용체 복합체를 포함하여 TGF-$\beta$신호전달체계와 TGF-$\beta$에 의한 세포성장 억제경로가 확인됨에 따라 TGF-$\beta$의 신호전달체계가 TGF-$\beta$/TGF-$\beta$ receptor complex 외에도 다른 여러 인자들과 상호 작용하거나 영향을 받을 수 있다는 것을 밝혀냈다. T$\beta$R-Ⅰ이 downstream substrates의 phosphorylation에 관여하는 것으로 보고되어졌기 때문에 T$\beta$RⅠ의 cytoplasmic domain과 interaction하는 단백질을 cloning하려는 시도에 의하여 FKBP-12, p21(RAS)farnesyltransferase-$\alpha$ 등이 밝혀졌다. 세포질로부터 핵내에까지 이르는 TGF-$\beta$ signaling pathway는 정확하게 밝혀지지 않고 있으나 추측되는 인자들을 통해 집중적으로 연구 중이다[8,21,23].

본 실험에 사용된 茵陳은 황달치료의 주약으로서, 임상에서 급·만성간질환의 치료에 淸熱利濕을 목표로 널리 사용되고 있다. 茵陳은 국화과의 여러해살이풀 사철쑥 *Artemisia capillaris* THUNB.의 어린싹이며, 性味는 苦微寒하고 淸熱, 利濕, 退黃하여, 급성간염, 만성간염, 간경변증, 간암 등에 널리 사용되고 있으며, 담낭염, 담낭결석 등의 질환에도 사용되고 있다.

茵陳을 주약으로 구성한 처방의 간기능 개선효과를 보고한 연구를 살펴보면, 禹[24]는 茵陳五苓散과 茵陳增量한 構成方이 흰쥐 손상간에 미치는 영향을 보

고하여 인진의 증량에 따른 간질환 치료효과의 유의성을 검증하였고, 李[9]는 茵陳을 主材로 한 數種의 처방이 실험적 간손상에 대해 간보호작용과 이담작용 및 지질강하작용 등의 효능이 있음을 보고하였다. 최근에 와서는 한약의 간보호효과에 대한 면역학적 · 유전학적 접근이 시도되고 있는데, 洪[12]은 茵陳淸肝湯加味方이 etoposide로 손상된 간세포에 대한 보호효과 및 apoptosis의 억제 효과를 연구하였고, 姜[25]은 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향을, 表[26]는 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을, 李[14]는 인진분획물이 간세포 활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을, 李[15]는 인진분획물이 TGFβ1-induced apoptosis에 미치는 영향을 연구하여 유의성 있는 결과를 보고하였다.

본 실험에서는 TGF-β1 mRNA, TGF-β1 signal pathway에 관련된 유전자(TβR-I, TβR-II, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA), TGF-β1의 target gene인 PAI-1 mRNA 및 간섬유화 관련 유전자들(CTGF, fibronectin, collagen Iα mRNA)의 발현과 합성의 증가여부를 RT-PCR법으로 분석하였다.

본 실험에서 인진을 분획하고, 인진 각 분획을 HepG2 cell에 처리하여 TGF-β1 mRNA, protein 분비에 미치는 영향을 살펴본 결과 H20, butanol, hexane 분획물 처리군에서 농도 의존적으로 TGF-β1 mRNA 발현양이 감소되어 인진의 특정 분획물은 인체 간세포의 TGF-β1 유전자 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단되었다. TGF-β1 protein 검사에서도 같은 결과를 보여 인진은 인체 간세포의 TGF-β1 생성을 억제함으로서 TGF-β1에 의해 촉진되는 것으로 알려진 fibroblast의 증식 및 간섬유화를 억제하는 효과를 가지고 있는 것으로 생각된다.

茵陳이 간세포의 TGF-β1 signal pathway에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 인진각분획을 HepG2 cell에 처리하여 TGF-β1 signal pathway를 구성하는 주요인자들, 즉 TGF-β1 receptors, Smad2, Smad3, Smad4 등의 mRNA를 변화를 PCR법을 이용하여 살펴본 결과 인진분획물은 TβR-I mRNA 발현과 TβR-II mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 반면, TGF-β1의 target gene인 PAI-1 mRNA 발현에는 있어서는 인진분획물에 의한 발현감소가 관찰되어 그 작용 부위가 target gene임을 시사하였다.

본 실험에서 사용한 [$^3$H]Thymidine Incorporation Assay는 TGF-β1이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향을 관찰하기 위한 것으로서, 인진분획물 (1, 10, 50, 100 ㎍/ml)과 TGF-β1을 처리한 후 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양을 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하는 방법이다. 그 결과 H20, ethylacetate, butanol의 순으로 TGF-β1에 의해 유도되는 fibroblast 세포증식촉진에 대한 억제작용이 관찰되어 인진이 TGF-β1 합성을 억제하는 성분과는 별개의 fibroblast 세포증식 억제성분을 함유하고 있을 가능성과 TGF-β1에 antagonist로 작용할 가능성을 시사하였다.

인진분획물이 TGF-β1에 의해 그 발현이 촉진되는 CTGF, fibronectin, collagen type Iα mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 각각의 인진 분획물 (1, 10, 50, 100 ㎍/ml)을 4시간 동안 처리한 후, TGF-β1 (2ng/ml)을 44시간동안 처리하고 상기 유전자의 mRNA 발현도를 조사하였다. 인진분획물의 투여 결과 Fibroblast 증식억제와 CTGF 발현억제와의 강한 상관성이 관찰되었다. Fibronectin mRNA 발현에 대하여는 주목할 만한 영향은 관찰되지 않았으며 모든 분획물의 100㎍/ml 투여군에서 다소의 발현감소양상이 인지되었으나 그 정도는 미미하였다. Collagen type Iα mRNA 발현에 미치는 영향에서는 ethylacetate 분획을 제외한 모든 분획물에서 collagen type Iα mRNA 발현의 감소효과가 관찰되어 인진분획이 간섬유화 억제의 효과를 가짐을 살펴볼 수 있었다.

이상에서 茵陳은 간세포를 대상으로는 TGF-β1 합성을 억제하여 섬유화 유발 첫단계 물질 생성을 억제함이 확인되었으며, fibroblast를 대상으로는 섬유아세포의 증식 및 섬유화유발 유전자의 발현을 억제함으로써 이차적으로 섬유화 억제 작용이 있음이 관

찰되었다. 본 연구를 통하여 이와 같은 인진의 작용은 $H_2O$분획 뿐 아니라 ethylacetate, butanol 분획에서도 관찰되어 인진에 함유된 여러 성분의 개별적 또는 복합적 작용이 여러 단계에서 이루어짐을 확인할 수 있었다. 이러한 기능을 통하여 최종적으로 인진에 의한 간섬유화 억제효과가 발휘되는 것으로 추정되며, 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

茵陳의 각 분획이 간세포의 TGF-$\beta$1 유도성 간섬유화에 미치는 영향을 확인하고자 TGF-$\beta$1 ELISA assay, thymidine incorporation assay를 시행하고, 각 유전자의 발현을 파악하기 위하여 quantitative RT-PCR을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 茵陳의 특정분획물 ($H_2O$, butanol, hexane)은 간세포 자체가 생성하는 TGF-$\beta$1 mRNA 및 단백질 발현을 억제하였다.

2. 茵陳의 특정분획물 ($H_2O$, butanol, hexane)은 TGF-$\beta$1에 의해 활성화되는 간세포의 signal pathway 중 target gene인 PAI-1의 유전자 발현을 억제하였으나, TGF-$\beta$1 수용체 및 세포벽에서 핵까지 신호를 전달하는 Smad2, 3, 4 유전자에는 영향을 미치지 않았다.

3. 茵陳의 특정분획물 ($H_2O$, ethylacetate, butanol)은 TGF-$\beta$1에 의하여 촉진되는 fibroblast의 세포증식을 억제하였다.

4. TGF-$\beta$1에 의해 조절되는 인자중 CTGF 유전자는 茵陳의 특정분획물 ($H_2O$, ethylacetate, butanol)에 의해 발현촉진이 억제되었고, collagen type I$\alpha$ 유전자는 인진의 특정분획물($H_2O$, butanol, chloroform, hexane)에 의해 발현촉진이 억제되었으나, fibronectin 발현 억제는 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 茵陳은 간세포를 대상으로는 TGF-$\beta$1 합성을 억제하였고 fibroblast를 대상으로는 세포증식과 섬유화유발 유전자의 발현을 억제함이 관찰되었다. 본 연구를 통하여 茵陳에 함유된 여러 성분의 간섬유화 억제작용을 확인할 수 있었으며, 이에 대해서는 향후 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌


1. 정영화. B형 만성간염에 대한 항바이러스 요법의 현재와 미래. 내과학의 최신지견. 1999:77-80.
2. 김연수, 서동진. 만성 C형 간질환에서 C형 간염바이러스 항원에 대한 항체 발현양상의 임상적 의의. 대한 소화기병학회지. 1994;26:833-841.
3. 全國韓醫科大學肝系內科學教授共著. 肝系內科學. 서울:東洋醫學研究院. 2001:257,324,325.
4. 張仲景. 仲景全書. 서울:대성문화사. 1984:225,240, 249,250,408,411.
5. 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. 1995:18-53.
6. Gandhi CR, Kuddus RH, Uemura T, Rao AS. Endothelin stimulates transforming growth factor-beta1 and collagen synthesis in stellate cells from control but not cirrhotic rat liver. Eur J Pharmacol. 2000;406(3):311-318.
7. Lieber CS. Prevention and treatment of liver fibrosis based on pathogenesis. Alcohol Clin Exp Res. 1999;23(5):944-949.
8. 박근철. Transforming Growth Factor-$\beta$와 악성종양. 대한생화학·분자생물학회. 1996;3(4):21-24.
9. 이장훈. 간질환치료제의 효능에 관한 실험적 연구. 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 -肝臟編. 大韓韓醫師協會. 1995:123-165.
10. 강경태. 茵陳淸肝湯加味方이 實驗的 흰쥐의 肝硬變症에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1997.
11. 박용진. 茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1998.
12. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳淸肝湯加味方이 肝細胞活性細胞週期 및 apoptosis에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1998;19(2):337-372.
13. 고홍. 인진사령산 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-Mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(3):174-185.
14. 이종훈. 인진분획물이 HepG2 세포에서 fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1999.
15. 이지현. 인진분획물이 인체간세포의 TGF-$\beta$1

induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회. 2000;20(1):53-61.
16. 지형준. 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해. 서울:한국메디칼인덱스사. 1998:638.
17. Sheila Sherlock, James Dooley. Diseases of the Liver and Biliary System. Blackwell Scientific Publications. 1993:357-359.
18. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267:1456-1462.
19. Ades EW, Hooper C, Pruckler JM. Cytoreductive therapy of multidrug-resistant hepatocellular carcinoma: negative regulation of growth using combination differentiation therapy. Pathobiology. 1992; 60(1):45-48.
20. Stephan K, Ansgar WL, Andrea K, Jurgen H, Hans PD, Peter S, Stefan RJ, Karl HM, Manfred B. TGF-β1 in liver fibrosis-an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. the Americal Physiology Society. 1999:1059-1068.
21. Buenemann CL, Willy C, Buchmann A, Schmiechen A, Schwarz M. Transforming growth factor-beta1-induced Smad signaling, cell-cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. Carcinogenesis. 2000;22(3):447-452.
22. Nishida T, Nakanishi T, Asano M, Shimo T, Takigawa M. Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro. J Cell Physiol. 2000;184(2):197-206.
23. Franziska Oberhammer, Wilfried Bursch, Wolfram Parzefall, Paul Breit, Evs Erber, Michaela Stadler and Rolf Schulte-Hermann. Effect of Transforming Growth Factor β on Cell Death of Cultured Rat Hepatocytes. CANCER RESEARCH 1991;51:2478-2485.
24. 우홍정. 茵陳五苓散과 茵陳增量한 構成方이 흰쥐 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1992;13(1): 234-241.
25. 강우성, 이장훈, 우홍정. 茵陳과 茵陳四苓散加減方이 간세포활성, 세포주기 및 DNA damage-induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999; 20(1):91-105.
26. 표임정. 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1999;22(1):119-140.