

인진이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향에 대한 연구

김영철, 이장훈, 우홍정

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Inhibitory Effect of Artemisiae Capillaris Herba on Fibrogenesis in Primary Cultured Rat Hepatic Stellate Cells

Young-chul Kim, Jang-hoon Lee, Hong-jung Woo

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Object : This study was performed to investigate the anti-fibrogenic effect of Artemisiae Capillaris Herba(ACH) on cultured rat hepatic stellate cells.

Methods : Hepatic Stellate Cells were obtained from a 350gm Sprague-Dawley rat by tissue perfusion system, and the cells for the study were selected after 3 passages of culture on non-coated plastic culture dishes which enable the cells to activate, thus producing collagens in the cell media. Cells were treated with various concentrations of Artemisia Capillaris Herba(ACH) extract powder for 24 or 48 hours. After the treatment, Soluble collagen, procollagen levels and the mRNA of the procollagen type I C were measured by using assay kit and RT-PCR method.

Results : Procollagen production by the hepatic stellate cells decreased after the treatment in a time-dependent dose-dependent manner. The mRNA expression decreased consistently with the volume of the secreted procollagen which indicates the herb has inhibitory effect on fibrogenesis of the liver by regulating one of the fibrosis associated genes in transcription.

Conclusion : These results suggest that ACH is beneficial in the treatment of cirrhotic patients as well as for the patients with chronic hepatitis.

Key Words: Hepatic Stellate Cells(HSCs), Artemisiae Capillaris Herba(ACH), Liver Cirrhosis, collagen, RT-PCR

1. 緒 論

간경변증은 진행성으로 간장에 섬유화가 발생되어 비가역적인 상태로 되는 것을 말한다. 정상적인 간장에는 collagen이 문맥역 주위에 집중되어 있고, 간혈적으로 Disse역이나 중심정맥 부위에 존재하고 있다. 그러나 간경변증에서는 collagen이 간소엽 전

체에 광범위하게 분포되어 있어서 혈류의 흐름과 간세포의 물질교환 등을 방해하게 된다. Collagen 과잉분비의 원인으로는 간장 자체가 어느 정도의 collagen을 합성하는 능력이 있기는 하지만, 간장내의 간성상세포(Hepatic Stellate Cell, Ito cell, fat storing cell)가 독소나 cytokine들 같은 외적인 자극에 의하여 활성화된 후 collagen의 분비를 과도하게 하여 발생하는 것으로 여겨진다¹.

서양에서는 간경변증의 원인으로는 알콜성 간질환에 의한 것이 가장 높은 비율로 나타나고, 잠재성, 바이러스성간염 등에 의하여도 잘 나타나는 것으로 보고되고 있다². 한편, 우리나라의 경우 간경

* 본 연구는 2004학년도 경희대학교 교비연구비 지원으로 수행되었음.

· 접수 : 2005. 9. 5. · 채택 : 2005. 10. 10.
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9116,
E-mail : hjwoo@khmc.or.kr)

변증을 앓는 환자의 대부분이 B형 및 C형 바이러스 성 간염과 관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 B형 간염 및 C형 간염으로 인하여 생긴 간경변증 환자에서 간암의 발생위험이 높은 것으로 알려져 있다³. B형간염백신의 접종이 확대되고 신생아에서의 예방접종 의무화로 인하여 장래에는 간경변증이나 간암으로 인한 사망이 줄어들 것으로 예견은 되지만, 아직까지는 만성간질환에 의한 사망률이 여전히 높은 상태이므로 여전히 사회적인 관심거리가 되고 있는 실정이다.

2002년도 통계청에서 발표한 우리나라 사망원인 통계에 의하면, 전체 사망률에 있어서 간질환이 사망원인 중 5위를 차지하고 있으며, 40대의 경우 만성간질환이나 간경변증으로 인한 사망률이 4위로 높게 나타나고 있다. 또한 그 남녀간의 비율이 전체적으로는 4:1 정도로 나타나지만 40대에서 남성의 사망률이 여성에 비하여 9배 정도로 높게 나타나는 것을 고려할 때, 남성에서의 사망률은 더욱 심각한 문제로 인식되고 있다. 간경변증에 의한 사망률은 경제적 성장, 의학수준의 향상에 따라 감소하는 추세에 있지만 여전히 높은 상태로 나타나고 있다³.

현재 간경변증의 치료에 대해서는 근본적인 치료 약제는 없이 단지 식이요법이나 심신안정 등 보존적인 치료에 의존하고 있는 실정이다. 간의 섬유화 과정의 기전이 점차 밝혀지고 있고⁴, 실험적 연구를 통하여 기전 및 섬유화억제 약물의 탐색이 시도되고 있지만⁵⁻⁸, 이 과정에서 사용되는 각종 약제들이나 방법이 아직 사람에게 직접 투여하여 효과를 기대하기는 어려운 난관들이 있는 실정이다.

한의학에서는 積聚, 鼓脹(脹滿), 單腹脹, 痞塊, 黃疸 등의 증후문에서 간경변증과 유사한 기록들이 나타나고 있다. 황달에 관한 기록에서 급 만성간질환에 대한 관찰이 이미 기원전부터 비교적 상세하게 이루어져왔음을 알 수 있으며, 또한 鼓脹(腹脹)은 사지가 가늘어지고 복부는 커져서 거미의 배모양으로 된다고 하여 심한 황달과 복수를 수반한 간경변증의 말기의 소견과 거의 일치하는 기록을 하고 있다⁹⁻¹⁰.

본 연구에서는 간장내에서 collagen의 합성에 직접적으로 관여하는 간성상세포를 분리하여 황달이나 고창에 사용되었던 약제 중에서 간질환의 치료에 가장 빈번하게 활용되어 온 인진을 처리하고 그 결과 나타나는 collagen의 합성량과 및 단백질합성에 직접 관련이 있는 mRNA의 발현량을 관찰하여 유의한 결과를 얻었다.

2. 재료와 방법

본 연구는 임상에서 반응되는 인진의 간경변증 치료효과에 대한 연구를 시험관내에서 하고자 한 것으로 rat의 liver에서 일차배양한 cell에 인진을 투여함으로써 collagen의 합성 및 mRNA 전사에 미치는 영향을 연구하였다.

1) 약제

한의학 문헌내용 및 기존의 연구결과에 기초하여 한약제들 중 만성간질환에 가장 빈번히 활용된 단미제인 인진의 in vitro 상에서 간경변증의 진행을 억제하는 효과에 대하여 살펴보고자 하였다. 약제는 한약규격집¹¹에 근거하여 경희의료원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였다.

| 약제 | 생약명 | 용량(g) |
|----|-------------------------------------|-------|
| 인진 | Artemisiae Capillaris Herba(ACH) | 100 |

2) 약제의 추출 : 약제 100gm을 환류추출기에 넣고 증류수를 1000ml 가하여 냉각기를 부착한 상태로 2시간씩 2회 가열 추출하였다. 추출액을 filter paper로 여과한 후 Rotary evaporator (Buchi, RE121, Swiss)로 감압 농축하여 농축액을 얻었다. 그런 다음 이 농축액을 동결건조기(EYELA, Japan)로 건조하여 14.02gm의 건조분말을 얻었으며 그 수율은 14.02%였다.

3) Isolation of Hepatic Stellate Cell(HSC)

간성상세포(HSC)의 분리는 tissue perfusion system을 이용하였다. 이후 OptiPrep(AXIS-

SHIELD, Norway)을 이용하여 1차로 간장의 비실질세포를 얻고, 얻어진 비실질세포에서 비중을 이용한 방법으로 2차적으로 간성상세포(HSC)를 분리하였으며 그 과정을 간단하게 설명하면 다음과 같다.

먼저 tissue perfusion system을 이용하여 마취한 350g의 S-D rat의 간을 collagenase로 digestion 시켰다. 이렇게 얻은 간조직을 50g에서 4분간 원심분리하여 혈구세포나 간세포 등 비중이 높은 세포들을 침전시키고 간성상세포가 포함된 상청(non-parenchymal cell이 포함됨)을 취하여 GBSS에 혼탁시켰다. 여기에 40% iodixanol을 첨가하여 iodixanol의 최종 농도가 17% (w/v) 되도록 한다. 그런 후 위의 용액을 넣은 tube의 위쪽에 약 2ml의 GBSS 용액을 첨가하고 20℃에서 400g로 15분간 원심분리한 후 GBSS와 17% iodixanol 사이에 띠를 형성하고 있는 층을 따낸다. 이 작업은 4℃ 환경에서 하도록 한다. 이런 다음 15%의 iodixanol 용액을 첨가하여 세포를 부유시킨다. 다음으로 10%(w/v) iodixanol을 5ml 정도 tube에 담고 그 위에 세포부유액을 동일한 분량으로 얻은 후 다시 위쪽에 약 2ml의 GBSS 용액을 첨가한 후에 1400g로 20분 정도 원심분리한 후 GBSS와 바로 아래의 저밀도 띠의 사이 부분을 취하였다.

4) 세포배양

얻어진 HSC를 culture dish로 옮긴 다음 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지는 2일마다 교환해 주었고, 세포가 단일층을 형성한 후 계대배양 하였다.

5) Cell activation 확인

간성상세포는 잠재성의 상태에서는 lipid를 함유하고 있다가 독소 또는 cytokine 등에 의해서 활성화되면 fibroblastic 하게 변하고 세포질 내에 smooth muscle alpha actin을 함유하게 되므로 anti-SMAA antibody(SIGMA, USA)를 이용하여 HSC의 활성화 상태를 확인하였다.

6) 약제처리

액기스형태로 정제된 약제를 배지에 농도별로 투여한 후 세포를 일정 시간동안 배양하였다. 즉 4g의 건조분말 약제를 100ml의 배지에 녹인 후 이것을 100% 검액으로 설정하였다. 실험에서는 적절한 농도로 희석하여 배지에 첨가하였으며, 최종 약제의 처리농도는 0.6%(240 ug/ml), 0.3%(120ug/ml), 0.15%(60ug/ml)로 결정하였고, 처리시간은 24시간, 48시간, 72시간으로 하였다.

7) Soluble Collagen Assay

HSC가 만들어내는 collagen의 양을 측정하기 위하여 Sircol Soluble Collagen Assay Kit (Biodye Science, UK)를 사용하였으며 제작사의 지시를 따라 측정하였다.

8) Procollagen Assay

Procollagen Assay는 Procollagen Type I C-peptide EIA Kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였으며, 제작사의 지시를 따라서 측정하였다.

9) RT-PCR

(1) RNA 추출

RNA-Bee™을 이용하여 분리하였다. 즉, culture dish에 1ml of RNA-Bee를 넣고 세포를 녹인 후 tube에 옮기고 0.2ml chloroform을 넣는다. 그런 다음 30초간 흔들어준 다음 4℃에서 5분간 방치하고 이후 12000g에서 15분간 원심분리한다. 이후 상청액을 취하여 다시 0.5ml of isopropanol을 넣고 10분간 실온에 방치한 후 다시 12000g로 5분간 4℃하에서 원심분리한다. 이렇게 생긴 RNA pellet에 75% alcohol을 넣고 잘 섞어서 녹인 후 7500g로 5분간 4℃에서 원심분리하여 RNA를 가라앉힌 후 가볍게 말리고 이후 DEPC로 처리된 RNase-free water에 녹인 후 농도를 계산하여 실험에 사용한다.

(2) cDNA 합성

추출된 RNA 1ug은 M-MLV RT(bioneer)와

random hexamer를 이용하여 20ul의 cDNA로 역전사시켰다. 1ug의 RNA를 5X M-MLV RTase reaction buffer 4ul, 100mM DTT 2ul, dNTP 2ul, RNase inhibitor 0.5ul, M-MLV RTase 1ul과 혼합하고 DEPC water를 보충하여 총 반응액의 양을 20ul로 맞추고 23℃에서 15분간, 42℃에서 1시간 그리고 95℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 만들었다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로는 beta-actin을 사용하였고, target gene으로는 type I procollagen gene을 사용하였으며, primer의 sequence는 다음과 같다.

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

(4) RT-PCR

합성된 cDNA를 대상으로 10X aplification buffer 17ul, dNTP 10pM, Primer set 각 10pM, cDNA 4ul, Taq polymerase 0.25ul를 넣고 나머지는 H₂O를 넣어 총 량을 50ul로 맞추었다. 첫 번째 cycle에서는 95℃ 5분, 55℃ 1분, 72℃ 1분으로 하였고, 이후 23cycles는 95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분으로 하였으며, 마지막 cycle은 95℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 10분으로 하였다.

이렇게 하여 생긴 산생물은 2% agarose gel을 이용하여 전기영동(110 Volt, 20분간)한 후 densitometer를 이용하여 각 밴드의 밝기를 정량화하였다.

10) 통계처리

인진을 농도별로 간성상세포에 처리하고 그 결과에 대하여 분산분석과 회귀분석을 실시하였다(SPSS 10.0 version).

Table

| Gene | Orientation | Sequences |
|--------------------|-------------|------------------------------------|
| Type I Procollagen | Sense | 5'- ACA GCA CGC TTG TGG AT -3' |
| | Antisense | 5'- GTC TTC AAG CAA GAG GAC CA -3' |
| beta-Actin | Sense | 5'- GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG -3' |
| | Antisense | 5'- AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG -3' |



Fig. 1. Microscopic confirmation of activated Hepatic Stellate Cells by anti SMAA antibody. Picture shows green actin compartments representing activated state of the HSC(X400)

3. 결과

1) Hepatic Stellate Cell activation 확인

Hepatic Stellate Cell이 collagen을 생성하는 상태로 되면 세포의 모양이 fibroblast 형태로 변하고 세포질 내에 smooth muscle alpha actin을 함유하게 되므로 anti-SMA antibody(SIGMA, USA)를 이용하여 HSC의 활성화 상태를 확인하였다. 형광염색을 통하여 간성상세포에서 핵 이외의 세포질 내에 형성된 초록색의 actin을 확인하고 활성화 되어 있음을 알 수 있었다(Fig.1.).

2) Soluble Collagen Assay

간성상세포를 5×10^4 /well로 24well plate에 seeding한 후 48시간이 경과한 후에 HSC가 만들어내는 collagen의 양을 측정하기 위하여 Sircol Soluble Collagen Assay Kit(Biodye Science, UK)를 사용하였으며 제작사의 지시를 따라 측정하였다. 실험결과 배양액 속의 collagen의 양은 일정하지 않은 결과를 보였으며 특히 세포를 용해시켜서 검출되는 양은 미미하였다. 이러한 결과는 kit로 검출할 수 있는 단위가 커서 간성상세포가 만들어내는 collagen의 양은 assay kit로 검출하기에 충분하지 않은 양이기 때문인 것으로 판단되었다(Fig. 2.).

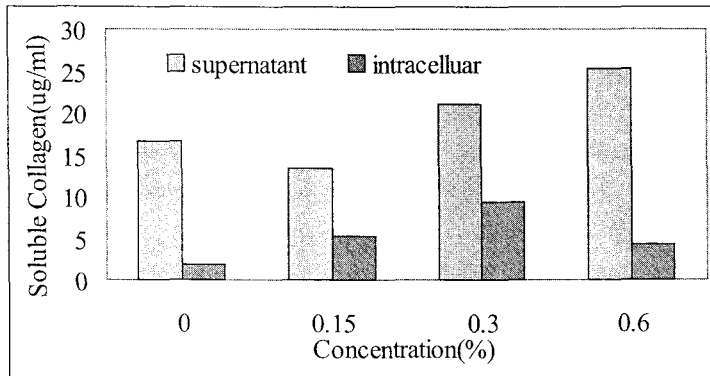


Fig. 2. Effects of Artemisiae Capillaris Herba on soluble collagen production in primary cultured HSCs. The soluble collagen produced by the cells were not sufficient to confirm the difference and only the tendency was considered here. So the error bars are not shown here.

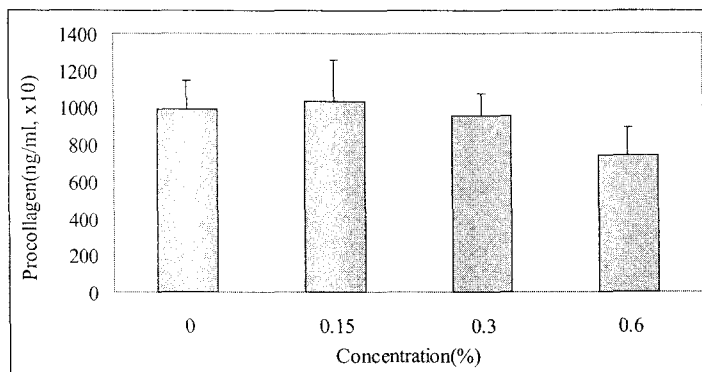


Fig. 3. Effects of Artemisiae Capillaris Herba on procollagen synthesis in HSCs. 10% FBS containing medium was used for the culture and for the drug dilution. Because of the interference of the FBS with the produced procollagen, the results showed only the tendency of inhibitory effect of ACH with no statistical significance.

3) Procollagen Assay

(1) 1차 실험

Procollagen assay의 condition을 잡기 위해서 간성상세포를 5×10^4 /well로 24well plate에 seeding 한 후 48시간이 경과한 후에 HSC가 만들어내는 procollagen의 양을 측정하기 위하여 Procollagen Type I C-peptide EIA Kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였으며, 제작사의 지시를 따라서 측정하였다. 실험 결과 통계처리를 하였을 때에 유의성 있는 결과는 없는 상태였으나 약재 처리 농도에 의존적인 collagen의 생성변화가 보였다 (Fig. 3.). 그러나 실험 배지 중의 serum에 의한 procollagen 생성량 측정의 오류가 역시 가능하다고 판단되었다. 본 실험에서도 cell을 용해시켜 내부의 procollagen량을 측정해 보았으나 검출될 수 있는 최저 한계치를 벗어나는 결과를 얻었으며, 이는 간성상 세포는 collagen을 형성하면 세포 외부로 방출시키는 것으로 판단할 수 있었고, 본 그래프에는 나타내지 않았다.

(2) 2차 실험

1차 예비실험에서 procollagen생성에 있어

서 약물의 처리농도에 의존적인 변화를 보이는 약재가 있었으나 통계학적인 유의성은 보이지 않은 것이 배경의 serum에 기인한 것으로 판단되어 이번에는 1% FBS를 사용하여 실험을 진행하였으며 약재의 처리는 각각 24시간, 48시간동안 하였다. 간성상세포를 5×10^4 /well로 24well plate에 seeding 하였으며 procollagen의 양을 측정하기 위하여 Procollagen Type I C-peptide EIA Kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였다. 24시간동안 약재를 처리한 후 나타난 결과를 통계처리 하였을 때, 인진투여군에서는 유의성 있는 농도의존적 procollagen 생성량 감소의 경향이 나타났으며($P < 0.01$), 48시간동안 약재를 처리한 후 나타난 결과를 통계처리 하였을 때에도 유의성 있는 농도의존적 procollagen 생성량 감소의 경향이 나타났다($P < 0.05$)(Fig.4).

4) RT-PCR

인진이 간성상세포의 collagen 합성에 미치는 영향을 유전자의 변화양상을 통하여 파악하여 보고자 procollagen type I C gene의 변화양상을 살펴보았다. House keeping gene 으로는 beta-actin을 선택

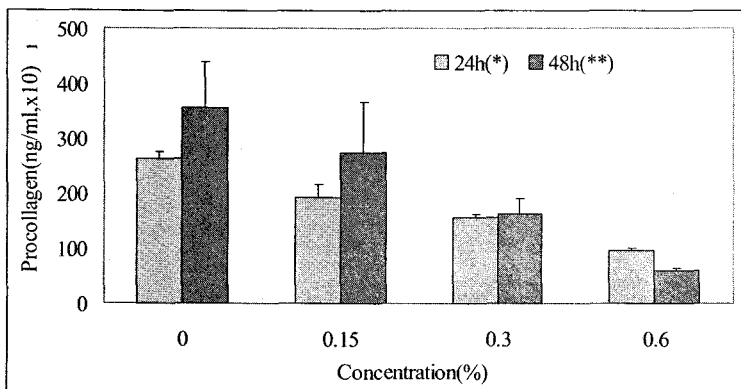


Fig. 4. Effects of Artemisiae Capillaris Herba on Procollagen Synthesis in HSCs. 1% FBS was used for the tests to eliminate the interference of serum with the produced protein. Procollagen Type I C-Peptide assay was done after 24h of treatment. P values of the dose-dependent regression pattern for the 24h and 48h groups were less than 0.05(*) and 0.01(**) respectively according to the regression analysis.

하였다. 실험결과 인진은 농도에 의존적인 유전자의 발현감소가 관찰되었으며 처리시간이 길수록 더 효과적인 결과가 나타남을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6).

4. 考察 및 結論

B형 간염 바이러스의 보유인구는 전 세계적으로 약 2억명을 넘어서는 것으로 알려져 있고, 동남아시아와 아프리카 지역에 높은 빈도로 나타나며 우리나라에서도 한 보고에서 전체 내원객 중에서 HBsAg 양성인 환자는 전체의 5.7%에 해당하는 것으로 나타났다¹². 만성 B형 간염을 방치할 시에는 간경변이나 간암으로 전변될 가능성이 대단

히 높고, 간세포암의 경우 간염바이러스 보유자에서 비보유자보다 100배 정도 높은 빈도로 발생함이 알려져 있다.

2002년도 통계청에서 발표한 우리나라 사망원인 통계에 의하면, 전체 사망률에 있어서 만성간질환이 사망원인 중 5위를 차지하고 있으며, 40대의 경우 만성간질환이나 간경변증으로 인한 사망률이 4위로 높게 나타나고 있다. 또한 그 남녀간의 비율이 전체적으로는 4:1 정도로 나타나지만 사회적으로 중추적 역할을 하는 40대에서 남성의 사망률이 여성에 비하여 9배 정도로 높게 나타나는 것을 고려할 때, 남성에서의 사망률은 더욱 심각한 문제로 인식되고 있다. 간경변증에 의한 사망률은 경제적 성장, 의학수준의 향상에 따라 감소하는 추세에 있지만 여전히 높은 상태로 나타나고 있다³.

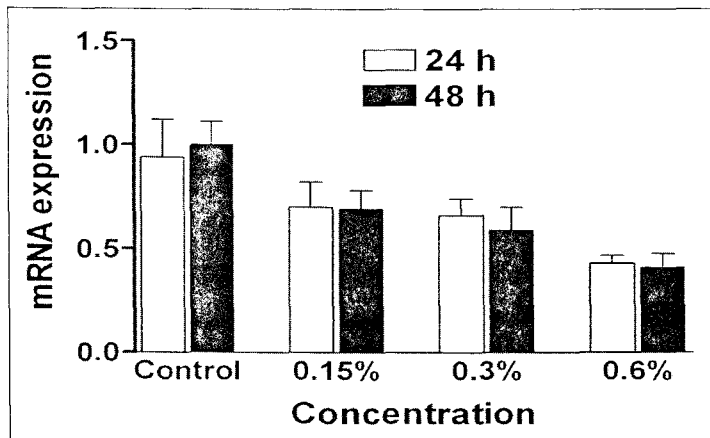


Fig. 5. Procollagen Type I C-mRNA expression after 24 and 48hrs of Artemisiae Capillaris Herba(ACH) treatment. Values in the Y-axis represent relative ratio of procollagen/actin gene expressions

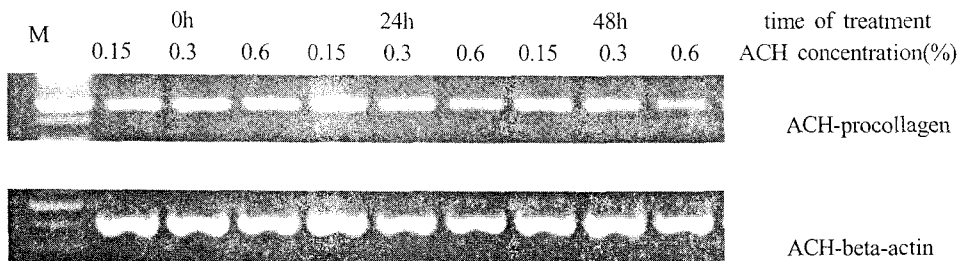


Fig. 6. Inhibitory effect of Artemisiae Capillaris Herba(ACH) on procollagen type I C gene expression

한의학에서는 적취, 고창(창만), 단복창, 비괴, 황달 등의 증후문에서 간경변증과 유사한 기록들이 나타나고 있으며 원인으로서는 칠정이나 간기울결 증 울증이 주된 원인이며 기체혈어에서 많이 발생하는 것으로 보고 있다. 간기울결은 정신억울, 흉민협통증이 나타나는데 만일 橫逆하여 脾胃를 克하면 腹脹呃氣, 不思飲食 等の 消化器症勢를 나타내며 氣가 鬱해서 濕痰이 생기고 血이 滯留하여 血鬱이 되면 痞塊가 생긴다고 설명하고 있다. 황달에 관한 기록에서 급 만성간질환에 대한 관찰이 이미 기원전부터 비교적 상세하게 이루어져왔음을 알 수 있으며, 황달과 함께 잘 나타나는 적취는 외부의 나쁜 기운, 정서적인 분노 억울, 부적절한 음식, 불량한 생활환경 등과 인체내부의 기운이 허약한 상태에서 전신을 순환하는 기운이 약하여져서 담, 식적, 사혈 등이 유발되는 것으로 인식하였다. 또한 고창(복창)은 사지가 가늘어지고 복부는 커져서 거미의 배모양으로 된다고 하여 심한 황달과 복수를 수반한 간경변증의 말기의 소견과 거의 일치하는 기록을 하고 있다^{9,10}.

이러한 내용들을 고려하여 볼 때, 한의학에서도 오래 전부터 급 만성간질환에서 간경변증, 간암으로의 전변이 잘 되는 것임을 증후론적으로 잘 인식하고 있었음을 알 수 있고 이러한 증후군에 투여되는 한약물은 간경변증의 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 인정되는 collagen의 합성을 억제하는 효과가 있을 것으로 사료되었다.

간섬유화는 간에서의 섬유소생성과 섬유소용해의 사이에 균형이 깨어져서 발생하는 것으로 세포외기질단백, 특히 type 1 collagen이 간장 내에 과도하게 축적되어 발생하는 것이 특징이다. 이러한 간섬유화에서 가장 중요한 역할을 하는 것이 간성상세포(hepatic stellate cell, lipocyte, fat storing or Ito cell)이다^{4,13}. 정상적인 간장에는 collagen이 문맥역주위에 집중되어 있고, 간혈적으로 Disse역이나 중심정맥 부위에 존재하고 있다. 그러나 간경변증에서는 collagen이 간소엽 전체에 광범위하게 분포되어 있어서 혈류의 흐름과 간세포의 물질교환 등을 방해하게 된다. Collagen 과잉분비의 주된 원인으로는

간장내의 간성상세포(hepatic stellate cell)가 독소나 cytokine들 같은 외적인 자극에 의하여 collagen의 분비를 과도하게 하여 발생하는 것으로 여겨진다¹.

그 동안 각종 간질환의 치료에 대한 한약물의 효능은 실험적 및 임상적 연구를 통해 다각적으로 검토되어 왔으며, 특히 茵陳이 濕熱黃疸에 주약으로 사용되어 왔던 점에 주목하여 이에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 중국에서 인진으로 쓰고 있는 사철쭉 뿐 아니라 우리나라에서 자생하는 더위지기를 기원으로 하는 茵陳을 사용하여도 실험적으로 이담작용을 비롯한 간보호작용을 나타내고 있음이 밝혀졌고¹⁴, 임상적으로도 黃疸를 수반하지 않는 바이러스성 간염에 茵陳을 주제로 하는 처방을 적용하여 뛰어난 간개선효과¹⁵와 HBeAg 음전율(약 30%)을 나타내고 있음을 보고¹⁶하여 이에 관한 연구가 계속되어 왔다. 또한 실험적으로 각종 간독성 병태에 대한 간보호작용 및 간기능의 회복이 뚜렷하였고, 치료약제의 안정성에 대한 평가에서도 매우 안전한 것으로 입증되었다. 또 분자생물학적으로 B형 간염 바이러스의 증식에 대한 억제효능에 관한 연구가 활발하게 진행되어 왔다¹⁷⁻²⁰.

한약물을 이용한 간경변증에 미치는 영향에 대한 기존의 연구로는, 물리적 또는 화학적 방법을 통해 간독성을 야기하거나 혹은 간경변증을 유발시킨 동물모델을 대상으로 한 것이 있고²¹⁻³, 간암세포주를 이용한 연구는 있으며²⁴, 실험실에서 간성상세포를 포함한 비실질세포의 1차배양세포를 통한 collagen의 합성에 미치는 한약의 효과에 관해서는 연구된 바 있다^{25,26}. 그러나 collagen 합성의 1차적인 원인으로 인정되고 있는 간성상세포만을 따로 분리하여 약제를 처리한 것은 한의학과 관련하여서는 아직 없는 실정이다.

간성상세포는 collagen을 생성할 수 있는 활성화 상태가 되면 세포의 모양이 fibroblast gudxofh 변하고 세포질 내에 smooth muscle alpha actin 을 함유하게 되므로 우리가 분리한 세포가 간성상세포인지 여부를 면역형광염색을 통하여 확인하였다(Fig. 1.).

한약제를 동결건조하고 다시 배지에 녹여서 세포

에 처리할 때 약제가 나타내는 세포독성은 약제에 따라 다양한 차이를 보이므로 세포독성은 나타나지 않으면서 약효과를 관찰할 수 있는 농도의 설정이 중요하다. 지금까지 각종 논문에서 소개된 일반적인 한약제의 농도는 일반적으로 500ug/ml 이하로 설정되어 이용되어 온 것을 참고로 하여 약제의 농도를 설정하였다. 즉, 4g의 건조분말 약제를 100ml의 배지에 녹인 후 이것을 100% 검액으로 설정하였다. 실험에서는 적절한 농도로 희석하여 배지에 첨가하였으며, 최종 약제의 처리농도는 0.6%(240ug/ml), 0.3%(120ug/ml), 0.15%(60ug/ml)로 결정하였고, 처리시간은 24시간과 48시간으로 하였다.

우선 soluble collagen을 측정하여 보았다. 우선 간성상세포를 5×10^4 /well로 24well plate에 seeding 한 후 48시간이 경과한 후에 HSC가 만들어내는 collagen의 양을 측정하기 위하여 Sircol Soluble Collagen Assay Kit(Biodye Science, UK)를 사용하였다. 실험결과 배양액 속의 collagen의 양은 일정하지 않은 결과를 보였으며 특히 세포를 용해시켜서 검출되는 양은 미미하였다. 이러한 결과는 kit로 검출할 수 있는 단위가 커서 간성상세포가 만들어내는 collagen의 양은 assay kit로 검출하기에 충분하지 않은 양이기 때문인 것으로 판단되었다(Fig. 2).

Collagen(types I, II, III, IV and V)은 생체에서 procollagen이라는 전구물질로 우선 합성이 된다. Procollagen은 collagen의 아미노기말단과 카르복실기말단에 propeptide라는 부가적인 peptide sequence가 포함되어있는 것으로 propeptide는 세포외기에서 삼중나선구조를 하도록 유도하게 된다. 분비될 때에는 propeptide가 분리되어 떨어져 나가면서 삼중나선구조의 collagen은 세포의 collagen 원섬유로 중합되게 된다. 그래서 떨어져 나온 propeptide의 양은 합성된 collagen의 생성량과 비례의 관계에 있게 되는 것이다. Collagen 합성의 정량적 검출은 Taubman et al.²⁷에 의해서 처음으로 시도되었는데, procollagen type I의 C말단 propeptide를 polyclonal antibody를 사용하여 방사선면역학적 방법으로 검출한 것이었다. 본 실험에서는 이러한 원리를 적용한 Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit를 이용하여 수행하였다.

Procollagen assay의 condition을 잡기 위해서 간성상세포를 5×10^4 /well로 24well plate에 seeding 한 후 48시간이 경과한 후에 HSC가 만들어내는 procollagen의 양을 측정하기 위하여 Procollagen Type I C-peptide EIA Kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였으며, 제작사의 지시를 따라서 측정하였다. 실험결과 통계처리를 하였을 때에 유의성 있는 결과는 없는 상태였으나 약제 처리 농도에 의존적인 collagen의 생성변화가 보였다(Fig. 3). 그러나 실험 배지 중의 serum에 의한 procollagen 생성량 측정의 오류가 역시 가능하다고 판단되었다. 본 실험에서도 cell을 용해시켜 내부의 procollagen량을 측정해 보았으나 검출될 수 있는 최저 한계치를 벗어나는 결과를 얻었으며, 이는 간성상세포는 collagen을 형성하면 세포외부로 방출시키는 것으로 판단할 수 있었다.

1차 예비실험에서 procollagen 생성에 있어서 약물의 처리농도에 의존적인 변화를 보이기는 했으나 통계학적인 유의성은 보이지 않은 것이 배경의 serum(10% FBS)에 기인한 것으로 판단되어 이번에는 1% FBS를 사용하여 실험을 진행하였으며 약제의 처리는 각각 24시간, 48시간동안 하였다.

24시간동안 약제를 처리한 후 나타난 결과를 통계처리 하였을 때, 유의성 있는 농도의존적 procollagen 생성량 감소의 경향이 나타났고($P < 0.05$, Fig. 4), 48시간동안 약제를 처리한 후 나타난 결과를 통계처리 하였을 때, 24시간 처리군에서와 비슷한 양상으로 유의성 있는 농도의존적 procollagen 생성량 감소의 경향이 나타났다($P < 0.01$, Fig. 4).

인진이 간성상세포의 collagen 합성에 미치는 영향을 유전자의 변화양상을 통하여 파악하여 보고자 procollagen type I C gene의 변화양상을 살펴보았다. House keeping gene으로는 beta-actin을 선택하였다. 실험결과 인진을 투여하였을 때 농도에 의존적인 유전자의 발현감소가 관찰되었으며 처리시간이 길수록 더 효과적인 결과가 나타남을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

이상의 결과에서 간세포보호효과가 이미 입증된 인진이 만성간질환의 경과 중 섬유화 및 경화에 있

어서 결정적인 역할을 하는 간성상세포의 collagen 합성에 있어서도 collagen type I C gene 의 발현을 억제하여 섬유화의 진행을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

5. 結 論

만성간질환에 빈용되는 인진이 간섬유화 과정에서 가장 근본적인 원인세포로 인정되고 있는 간성상세포의 collagen 합성 및 그 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하기 위하여 실험동물의 간에서 성상세포를 분리하고 일차배양하여 약물을 처리한 후 나타나는 collagen 합성량과 collagen type I C gene 의 발현에 미치는 영향을 살펴본바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간성상세포에 대한 인진의 투여는 soluble collagen의 양에는 농도에 비례하는 억제효과를 관찰할 수 없었다. 이는 생성된 soluble collagen의 양이 너무 적어서 assay kit로 검출하기에 충분치 않은 양이 문제인 것으로 판단되었다.
2. 세포내에 생성된 procollagen의 양은 미미하였으며, 이는 세포가 collagen을 생성하면 세포외로 방출되는 것임을 보여주는 결과로 판단된다.
3. 간성상세포에 인진을 24시간 및 48시간 동안 처리한 후 procollagen의 생성량을 측정하여 결과 농도에 의존적으로 감소되었다.
4. 인진의 투여는 collagen type I C gene 의 발현을 억제하여 collagen의 생성을 억제함을 알 수 있었다.

이상에서 인진은 간섬유화의 가장 근본적인 원인 세포로 인식되고 있는 간성상세포에서 collagen의 생성을 억제하는 효능이 있음이 관찰되어 향후 임상에서 만성간질환의 치료 뿐 아니라 간섬유화의 진행을 억제하여 간경변증을 예방 및 치료하는데 유효하다는 근거를 제시한 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Ramzi S, Cotran, Vinay Kumar, Stanley L. Robbins. Pathologic Basis of Disease. 5th edition. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992, p.834-5.
2. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL et al.: Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th edition. New York: McGraw Hill, 1998, p.1685, 1704-10.
3. 통계청. 사망원인통계연보, 2002.
4. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. Journal of hepatology. 2003;38:s38-s53.
5. Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ et al. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. Gut. 2001;49(4):577-83.
6. Simile MM, Banni S, Angioni E, Carta G, De Miglio MR, Muroli MR. et al.: 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. J. Hepatology. 2001;34:386-394.
7. Chiu JH, Ho CT, Wei YH, Lui WY, Hong CY. In vitro and in vivo protective effect of honokiol on rat liver from peroxidative injury. Life Sciences. 1997;61:1961-71.
8. Ali S, Ansari KA, Jafry MA, Kabeer H, Diwakar G. Nardostachys jatamansi protects against liver damage induced by thioacetamide in rats. J. Ethnopharmacology. 2000;71:359-63.
9. 장중경. 급궤요략. 서울: 행림서원; 1984, p.392-4.
10. 우홍정, 이장훈, 김영철, 강병기, 김강산, 강윤호 외. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001, p. 323-50.
11. 경희의료원. 한약규격집. 서울: 대성문화사; 1993.
12. 주광로, 방성조, 송병철, 윤광희, 주연호, 양수현

- 등. 1990년대 후반 한국 성인의 B형 간염 바이러스 표지자 보유 양상: 건강검진 수검자 70,347명의 성적 조사. 대한소화기학회지. 1999;33(5):642-52.
13. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanism and treatment strategies. *N. Engl. J. Med.* 1993;328:1828-35.
 14. 김정제. 인진오령산의 치료효과에 관한 실험적 연구. 경희대한의대는문집. 1978;1:15-8.
 15. 김병운, 김정제. 간염유관항원양성 만성간질환 2례. 경희대한의대는문집. 1978;1:189.
 16. 우홍정. 만성 B형 간염에 대한 인진청간탕의 효과. 제2회 한중학술대회(간장병)논문집. 대한한 의사협회. 1995;18-53.
 17. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕가 미방이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한 의학회지. 1998;19(1):145-64.
 18. Keum WK, Kim JY, Kim JY, Chi SG, Woo HJ, Kim SS, et al. Heterogeneous HBV mutants coexist in Korean hepatitis B patients. *Experimental & Molecular Medicine.* 1998;30(2):115-22.
 19. 우홍정, 이장훈, 김영철. 수종의 한약재가 HepG 2.2.15 Cell의 HBeAg발현 억제에 미치는 效果. 대한한방내과학회지. 1999;20(1):122-32.
 20. 이종훈, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000; 21(3):363-8.
 21. 강병기, 홍석의. 육울탕 및 산울탕이 DMN및 담도결찰로 유발된 간경변증에 미치는 영향. 제2회 한중학술대회(간장병)논문집. 대한한 의사협회. 1995;91-122.
 22. 박대영. 향사평위산과 당귀활혈탕이 DMN및 담도결찰로 유발된 간경변에서 collagen 생성 및 간세포재생에 미치는 영향. 원광대학교대학원. 1993.
 23. 이진목. 가감인진호탕 수침액이 담도결찰로 유도된 간손상에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 1993.
 24. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진이 TGF- β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한 의학회지. 2001;22(3):141-55.
 25. Kim YC, Lee JH, Woo HJ. Effect of Samul-tang(Siwu-tang) on Procollagen Synthesis in Cultured Murine Hepatic Non-parenchymal Cells, *Korean Journal of Oriental Medicine.* 2003;24(4):120-6.
 26. 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳清肝湯이 흰쥐의 간조직에서 비실질세포의 procollagen 합성 억제에 미치는 효과에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2003;24(4):817-25.
 27. Taubman MB, Goldberg B, Sherr C. Radioimmunoassay for human procollagen. *Science.* 1974; 186(4169):1115-7.