

## 천연식물추출물(RIP)이 쥐의 간섬유화 치료에 미치는 영향<sup>†</sup>

조수현

순천청암대학 간호과 교수

## Therapeutic Effects in the RIP-treated Liver Fibrosis Rat Model

Soo Hyun Cho

Professor, Dept. of Nursing, Suncheon Cheongam College

### Abstract

Chronic liver diseases and hepatic cancer have been reported as 10% of cause of death in Koreans. Regardless of various causes, chronic liver disease accompanies commonly hepatic fibrosis. But still the mechanism of hepatic fibrosis remains poorly understood.

Using the dimethylnitrosamine(DMN)-induced hepatic fibrosis rat model, We performed to evaluate the possible therapeutic effect of RIP(extracts of *Phellodendron amurense* and *Patrinia scabiosaefolia*) and to investigate the changes in referential connective tissue proteins(TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -smooth muscle actin, and vimentin) as a marker of fibrogenesis.

For these purposes, liver tissues were stained with H & E, and Azan staining for estimation of developing fibrosis. In the DMN-treated rat liver tissue, fibrosis were developed forming incomplete septal fibrosis. Whereas, in the RIP-treated rat liver tissues, the fibrosis were decreased recovering to normal morphology.

The expressions of TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA), and vimentin were increased in the DMN-treated rat liver tissues, but decreased in the various areas of RIP-treated rat liver tissues.

According to these results, RIP could be a possible therapeutic agent to reduce hepatic fibrosis, and the TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, and vimentin could be possible indicative markers of hepatic fibrosis development and recovery.

---

**Key words** : RIP(extracts of *Phellodendron amurense* and *Patrinia scabiosaefolia*), liver fibrosis, TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -smooth muscle actin, vimentin

---

\* Corresponding author : Soo Hyun Cho, Dept. of Nursing, Suncheon Cheongam College

Tel : 82-19-624-8245 Fax : 82-61-740-7180 E-mail : csh216@hanmail.net

<sup>†</sup> 2003년 2월 경상대학교 박사학위 논문임

## 1. 서론

간은 인체 대사 기능에 있어서 가장 중요한 장기로 가로막 바로 아래 오른쪽 상복부에 위치하며 오른쪽과 왼쪽으로 나뉘어져 있다. 중앙부에는 쓸개관(bile duct), 간동맥(hepatic artery) 및 문맥(portal vein)이 간으로 들어가는 간문이 있다. 간으로 들어간 쓸개관, 간동맥 및 문맥 등은 결합조직(connective tissue)으로 싸여 있다. 간으로 들어오는 혈액은 간동맥과 문맥으로 들어오며 간세포와 간세포 사이에 있는 굴모세혈관(sinusoid)을 통해 영양이나 산소를 공급하고, 중심정맥(central vein)으로 부터 간정맥(hepatic vein), 아래대정맥(inferior vena cava)을 경유해 심장으로 환류된다.

간경변은 간세포 괴사가 생기고 그 부위에 간세포가 충분히 재생되지 못하면 결합조직의 증가가 일어나고 섬유화가 생긴 것이다. 한편 간세포는 탈락된 간세포를 보충하기 위해 왕성한 재생력을 보인다. 간의 섬유화로 인한 간경변의 결절(nodule)은 간세포의 재생과 섬유화가 동시에 진행되어 형성된 것이다(Sherlock & Dooley, 1997).

우리나라는 간질환, 특히 바이러스성 B형 간염의 만연 지역으로서 만성간질환 및 간암에 의한 사망률이 총 사망원인의 10%를 차지할 정도로 국민건강에 심각한 문제가 되고 있다. 그러나 사람에서 간의 섬유화와 간경변은 장기간에 걸쳐 형성되고 있어 간섬유화의 발생 및 치료에 대한 연구는 항상 어려움이 따르고 있다(Kusunose et al., 2002; Weng, Cai, & Liu, 2001).

간경변은 진행과정에서 합병증으로 나타나는 복수(ascites), 정맥류(varices), 간성뇌증(hepatic encephalopathy), 간암(liver cancer) 등의 발병 여부에 따라 그 예후가 결정된다(Gentilini, Laffi,

Villa, Romanelli, & Blendis, 1999). 현재 알려진 간경변의 원인으로는 B형 및 C형 간염바이러스, 알코올, Amiodarone 등의 항부정맥제(antiarrhythmic drugs)(Giannattasio, Salvio, Variale, Picciotto, Costanzo, & Visconti, 2002) 등이 거론되고 있다. 또한 지속적인 간담즙울체(hepatobiliary congestion) 및 드물게는 여러 가지 유전성질환 및 자가면역성질환 등이 간섬유화의 원인으로 알려져 있다(Johnson, 1993). 그러나 이러한 다양한 원인에도 불구하고 간섬유화는 결국 비슷한 구조적인 결과를 초래한다(Sherlock & Dooley, 1997). 이들 원인 중 최근에는 만성알코올중독이 간경변의 주요 원인으로 대두되고 있다(Stewart, Jones, & Day, 2001). 알코올성지방간은 음주를 중단함으로써 회복될 수도 있으나 알코올성간염으로 진행하거나 염증성물질들이 다량으로 침윤된 경우에는 회복되지 않는다고 알려져 있다(Berghaus & Beuers, 2001).

일반적으로 간손상(hepatic injury)이란 급성 간염에서 시작하여 만성간염, 간경변을 거쳐 간암에 이르는 간질환 중에서 간경변과 간암 등의 만성간질환을 의미한다. 그러나 만성간염이 있는 모든 환자에서 간경변이 발생하는 것은 아니고 일부의 환자에서만 간경변으로 진행하지만 간염이 심할수록 그리고 오래 지속될수록 간경변으로의 진행이 높다고 알려져 있다(Gentilini et al., 1999). 따라서 간경변에 대한 조기 발견, 적극적인 치료대책 및 예방과 함께 간경변에 대한 병리기전을 밝히는 것이 시급하다.

간의 섬유화에는 많은 성장인자들이 관여하고 있으며 그 영향을 받는 결합조직 단백질의 축적이 이루어진다. 따라서 간의 섬유화에 대한 치료를 위해서는 성장인자의 발현의 증가 및 관련단백질의 축적을 감소시킬 수 있는 많은 연구들이 진행되어야 한다고 사료된다.

최근에는 그 동안 한방이나 민간에서 간질

환의 치료에 효과가 있는 것으로 알려진 물질들을 대상으로 그 치료효과를 평가하려는 많은 노력이 경주되고 있다. 오미자(Schizandrae Fructus)로부터 분리된 Schizandrin C의 합성동족체인 biphenyl dimethyl dicarboxylate(DDB)는 현재 임상에서 간염치료제로 사용되고 있으며 상승된 트랜스아미나제(transaminase) 값을 하강시키는 효과가 보고(Nan, Park, Kim, Ko, & Sohn, 2000)되고 있는 것이 그 예라 할 수 있다. 또한 Lycium chinense fruit에서 추출된 Zeaxanthin dipalmitate 역시 간의 섬유화를 줄이는데 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(Kim, Lee, Kim, Kim, Kim, Park, Kim, & Kim, 2002). 이러한 한방이나 대체요법은 천연물이라는 점과 오랜 세월 임상적인 효력이 어느 정도 증명되어 있다는 점에서 그 약효 및 부작용 등에 대한 깊이 있는 연구가 진행될 경우에는 치료제로서의 활용이 충분히 가능하리라 본다.

따라서 본 연구에서는 간섬유화 유발 동물에서 간의 병리 상태를 조직학적으로 확인하고, 천연식품 추출물인 RIP가 간섬유화의 치료에 효과를 지니고 있는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여 DMN을 투여하여 간의 섬유화가 유발된 흰쥐를 대상으로 황백나무와 마타리풀에서 추출한 천연물을 혼합하여 만든 RIP를 흰쥐의 위장관에 투여한 후 간섬유화의 유발 정도를 일반적인 H & E 염색 및 아교섬유를 특이적으로 염색하는 Azan 염색법으로 비교하였다. 또한 일반적인 조직병리학적 검사 외에 간섬유화 진행의 억제 및 치료효과를 확인하 섬유화의 정도에 따라 발현이 조절되는 TGF- $\beta$ 1(Hsu, Chiu, Lee, Lin, & Huang, 2004),  $\alpha$ -SMA(Hsu et al., 2004), 및 vimentin(Kaye & Pawlina, 2003)의 면역조직화학염색을 통한 발현의 변화를 관찰하여 섬유화 진행의 정도를 객관화하고자 하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 실험동물 및 DMN 투여농도 결정

DMN은 간에서 formaldehyde, methanol 및 알킬성 중간물질들로 분해된 후 핵산 또는 단백질들과 결합하여 메틸화된 거대분자로 변하고 결국에는 간세포의 피사 및 간조직에서 collagen과 같은 섬유성기질단백질들의 침착을 야기시킨다(Friedmann, 1993; George & Chandrakasan, 1996).

#### 1) 실험동물군

실험동물은 10주령의 수컷 Sprague-Dawley 종 흰쥐(350~370gm)를 사용하였다. 출생, 발육상태 그리고 발육환경이 동일한 쥐를 구입하여 대조군과 실험군으로 분류하였다.

실험동물은 모두 세 군으로 설정하였다. 정상대조군은 생리식염수를 주사한 군으로 하였으며, 간섬유화를 유발시키기 위한 DMN 투여군을 질병대조군으로, 간섬유화의 치료를 위한 RIP 투여군을 치료군으로 설정하였다.

여러 번의 예비실험을 거쳐 2~3번의 실험을 반복하였으며, 시작 당시에는 각 군당 7~8마리 이상 총 31마리로 실험을 하였으나 실험 때 마다 2~3마리씩 죽어 일률적으로 각 군마다 4마리의 흰쥐로 실험을 하게 되었다.

#### 2) DMN 투여농도 결정

DMN(dimethylnitrosamine; Sigma, St. Louis, MO)에 의한 간의 섬유화 모델은 George와 Chandrakasan(1996)이 정립한 모델이 널리 알려져 있으나 본 연구에서는 예비 실험으로 10mg/kg 와 20mg/kg의 DMN을 1주에 3일 연속투여하고 4일간 쉰 후 다시 3일 투여하는 방법으로 2주간 복강 주사하여 4~6주 후 적출한 간조직에서 섬유

유화를 관찰할 수 있었다(Data not shown).

예비실험에서 20mg/kg의 DMN 농도로 3일 연속 2주간 투여한 실험군의 동물은 3주째에 모두 사망하였으며 이는 간의 섬유화가 너무 심하게 유발되었기 때문으로 판단되어 실험에서 배제했다(Data not shown).

한편 10mg/kg의 농도로 3일 연속 2주간 DMN을 투여한 실험군에서는 간괴사, 간섬유화 및 중심정맥의 사라짐 등 간경변의 소견과 함께 극단적인 치사율에서 벗어나 실험에 적절하게 사용할 수 있는 농도로 인식되었다.

## 2. RIP의 투여

간섬유화 유발의 억제효과를 보기 위하여 RIP를 투여하였다. RIP는 (주)메드빌로 부터 제공받아 사용하였으며, (주)메드빌에서 제조한 방법은 다음과 같다. RIP의 재료가 되는 황백 나무와 마타리풀을 음지에서 잘 말린 후 1~2주간 chloroform으로 추출하여 진공 농축하였다. 이것을 chromatography로 분리하여 다시 한번 진공 농축하였고 각각의 분말을 적절한 농도로 혼합하여 RIP를 만들었다.

RIP는 흰쥐의 위장으로 직접 투여하였으며, 대조군은 같은 양, 같은 기간, 같은 방법으로 생리식염수를 위장관내로 투여하였다. 투여방법은 Oral injection으로 쥐가 움직이면 바늘에 의해 식도나 위가 손상될 수 있으므로 쥐를 ether를 이용하여 마취시킨 후 배가 위로 오도록 눕히고 입과 식도, 위가 어느 정도 일직선이 되게 눕혀 길이가 약 10cm인 Oral Zonde needle을 입을 통해 7~8cm 정도를 넣어 위까지 가게 한 후 RIP를 주입시켰다.

RIP의 투여 농도를 결정하기 위하여, 여러 선행논문을 참고하여 농도의 기준을 설정하였으며, 50mg/kg의 RIP를 투여한 군(RIP50), 200mg/kg의 RIP를 투여한 군(RIP200), 400mg/kg의 RIP를 투여한 군(RIP400)으로 나누어 매일 위

장관내로 투여하였다. RIP50인 경우에는 대조군과 비교했을 때 거의 효과가 없었으며, RIP의 농도가 증가 할수록 효과가 크다는 것을 확인할 수 있었다(Data not shown). 따라서 본 논문에서는 400mg/kg의 RIP를 4주 동안 지속적으로 투여하여 간섬유화 치료효과를 관찰하였다.

## 3. 간기능 혈청효소의 측정

조직채취에 앞서 간기능의 판별을 위하여 심장에서 채취한 혈액의 혈청에서 GOT(glutamic oxalacetic transaminase) 및 GPT(glutamic pyruvic transaminase)를 측정하였다. 흰쥐의 심장에서 혈액을 채취한 후 얼음에서 10분간 반응하였고 3,000rpm에서 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장을 각각 AST(Aspartate aminotransferase), ALT(Alanine aminotransferase) kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 반응한 후 340nm에서 흡광도를 측정하여 수치를 구하였다. 각각의 값은 student's t-test로 의미성을 검증하였고  $p < 0.05$ 인 경우를 의미있는 변화로 판단하였다.

## 4. 조직처리

H & E, Azan 염색 및 면역조직화학염색을 위한 조직을 준비하기 위해서 먼저 흰쥐를 ether로 흡입마취 시킨 다음 관류고정을 위해 사지를 벌려 고정시켰다. 흉부를 절개하여 심장을 노출시킨 다음 원심실에 바늘을 꽂아 1 X PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )로 먼저 혈액을 씻어낸 후 4% neutral buffered paraformaldehyde(NBP)로 관류 고정하였고 간을 적출하여 4% NBP로 하루 동안 고정하였다. 고정된 간은 흐르는 물에 2시간 동안 수세한 다음 70% alcohol에서부터 100% alcohol까지 각각 1시간씩 단계적으로 반응하여 탈수화시켰

다. Xylene에서 1시간씩 3회의 투명화를 거쳐 vacuum oven에서 3시간 동안 파라핀 침투를 시켰다. 파라핀으로 조직을 포매한 후 5 $\mu$ m 두께로 연속절편을 제작하였다. 절편된 조직은 gelatin으로 덮어씌운 슬라이드에 올린 후 42 $^{\circ}$ C 온열기 위에서 30분 동안 말려서 사용 전까지 상온에 보관하였다.

### 5. H & E 염색

파라핀 절편을 xylene에서 탈파라핀 시키고 100% alcohol에서부터 70% alcohol 까지 단계적으로 수화시킨 다음 흐르는 물에 수세한 후 염색에 사용하였다. Mayer's hematoxylin 용액에 1분 동안 염색하고 산성용액에서 coloring 하고 충분한 수세를 거친 후, 2분 동안의 Eosin 염색을 시도하고 알코올 농도를 높여 가며 (ascending alcohol series) 탈수하였다.

### 6. Azan 염색

Azan 염색은 4 단계의 염색과정을 거친다. 각각의 과정을 보면 우선 azocarmine solution (1%)은 1gm의 azocarmine G(E. Merck Darmstadt, Germany)를 100ml의 증류수에 녹이고, 3MM paper로 filtration 한 후, 1ml의 glycial acetic acid(Sigma, St. Louis, MO)를 첨가하여 만들었다. 두 번째로 aniline solution은 1ml의 aniline(E. Merck Darmstadt, Germany)을 1000ml의 96% ethanol에 섞어서 만들었으며, acetic acid-ethanol은 96% ethanol 100ml과 1ml의 glycial acetic acid를 섞어서 만들었다. 이어 phosphotungstic acid solution은 100ml의 증류수에 10gm의 tungstoposphoric acid(E. Merck Darmstadt, Germany)를 녹여서 만들었다. 끝으로 methyl blue-orange solution은 0.5gm의 methyl blue(E. Merck Darmstadt, Germany)와 2gm의 orange G(E. Merck Darmstadt,

Germany)를 100ml의 증류수에 녹인 후 8ml의 96% acetic acid를 첨가하였다. 이 용액을 끓인 다음 3MM paper로 filtration한 후에 사용하였다.

이렇게 준비된 각각의 염색액으로 Azan 염색을 시행하였다. 우선 조직을 60 $^{\circ}$ C로 데워져 있는 1% azocarmine solution에 10분 동안 반응한 후 증류수로 수세하였다. Aniline solution에서 핵이 염색될 때까지 반응시킨 다음 acetic acid-ethanol로 aniline solution을 씻어주었다. 그런 다음 phosphotungstic acid solution에 1시간 동안 반응시킨 후 증류수로 씻어주고 methyl blue-orange solution에서 1시간 동안 염색하고 증류수로 씻어주었다. 70% alcohol부터 100% alcohol 까지 단계적으로 탈수화 시킨 후 xylene에서 투명화 시키고 커버슬라이드를 덮어 영구포매 하였다. 이를 광학현미경하에서 관찰하였다.

### 7. 면역조직화학염색

필요한 조직 슬라이드들을 xylene에 5분간 3번 반응시켜 파라핀을 제거시킨 후 alcohol series를 거쳐 수화시켰다. 연속 절편된 간 조직을 일정한 간격으로 일반 염색하여 조직의 이상 유무를 확인한 후에 인접절편에 면역조직화학염색을 시행하였다. 0.1 M PBS로 5분간 3번 세척한 후 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30분간 처리하고, normal goat serum을 조직에 충분히 점적하여 30분 동안 반응시켰다. 혈청을 깨끗이 닦아낸 후, 1차 항체를 점적하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시켰다. 1차 항체의 희석 배율은 TGF- $\beta_1$  항체(sc-146, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)는 1 : 200,  $\alpha$ -SMA 항체(Neomarker, Ferment, CA)는 1 : 200으로, vimentin 항체(Oncogene, Cambridge, MA)는 1 : 400으로 희석하여 사용하였다. 0.1 M PBS에 5분 동안 3번을 세척한 후, 2차 항체(biotinylated IgG)를 1시간 동안 상온에서 반응시키고, 또 같은 방법으로 세척한 후,

ABC 용액(Avidin and Biotinylated horseradish peroxidase macromolecular Complex kit, VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite<sup>®</sup>)에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 위와 같은 방법으로 세척 후, 0.025% DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, D-5637, C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub> · 4HCl, FW 360.1, SIGMA), 0.07% NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 섞어 발색 반응을 보았다. 먼저 이 시약은 DAB를 0.1M의 PBS와 섞어서 충분히 녹이고, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 넣어 섞은 후 3 MM paper로 여과하여 사용 직전에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣었다. 발색 시간은 각 항체들의 조직 특이성에 따라 서로 다르게 처리하였다. 발색 정도는 틈틈이 발색 과정의 조직들을 현미경상에서 관찰하였다. 발색 후 다시 위와 같은 방법으로 세척한 후, 알코올 농도를 높여 가며 각각 2분씩 탈수하였으며 xylene으로 투명화를 거쳐 영구 포매하고 현미경상에서 관찰하였다.

## 8. 자료분석 방법

면역조직화학염색의 면역반응성(immunoreactivity)은 조직학 전공자 두 명이 각자 관찰한 결과를 종합하여 표기하여 그 결과를 음성 반응은(-)로, 약한 염색성은(+)로, 중간 정도의 염색성은(++)로, 강한 염색성은(+++)로 표시하였다.

실험 결과 reading은 각 군당 특정한 개체를 선택하여 한 것이 아니라 각 군당 4마리의 조직화학 결과를 평균하여 결과로 제시하였다.

## III. 연구 결과

### 1. 간 기능 혈청효소의 변화

간 기능의 판별을 위해 동물을 희생시키기

직전에 심장으로부터 채취한 혈액의 혈청에서 GOT 및 GPT를 측정하였다. 생리식염수를 주사한 정상군은 GOT와 GPT가 각각 75±11.8u/L와 39.7±5u/L로 간수치가 정상범위였다. 그러나 DMN을 투여하여 간의 섬유화를 유발한 동물의 경우에는 GOT와 GPT가 각각 287.7±41.4u/L와 90.7±13.1u/L의 결과를 보여 정상군에 비해 간 손상 정도가 심각한 것으로 나타났다. DMN 투여 후 RIP로 치료한 군에서는 각각 205.0±23.9u/L와 55.7±8.7u/L의 결과를 보여 DMN군에 비하여 RIP로 치료한 군이 간 손상 정도가 작은 것으로 나타났다(Fig. 1).

## 2. 일반 염색에 의한 간섬유화 치료 효과의 판단

### 1) H & E 염색

간의 일반적인 형태를 관찰하기 위하여 H & E 염색을 시행하였다. 정상군에서는 중심정맥(central vein)으로부터 간세포줄이 방사상으로 형성되어 있었으며 문맥구역(portal area)에서도 간동맥(hepatic artery), 담즙관(bile duct), 문맥(portal vein)이 잘 발달되어 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A).

그러나 DMN을 처리한 군에서는 문맥구역 부위에서 각각의 구조물을 구별할 수 없을 정도로 심한 간의 파괴가 있는 것을 볼 수 있었다. 또한 간세포의 정상적인 배열을 확인할 수 없었으며 일부의 혈관들은 커져 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 문맥구역을 중심으로 한 간의 섬유화는 결절과 같은 둥근 구조물들을 형성하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2B).

그러나 RIP로 치료한 군에서는 다시 중심정맥을 향한 간세포줄이 나타나기 시작했으며 문맥주변부로 판단되는 부분들도 모습을 보이고 있었다(Fig. 2C).

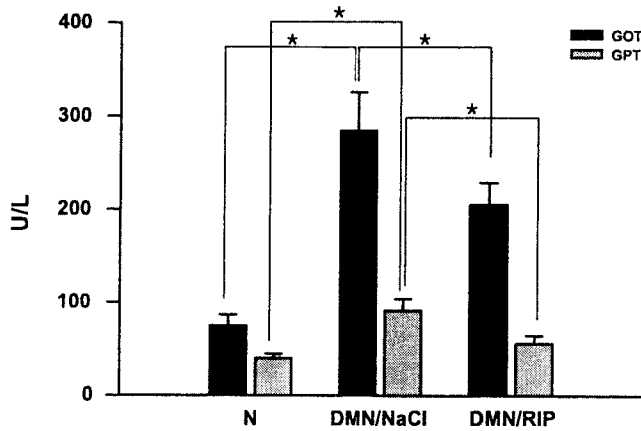


Fig. 1. Diagram of GOT and GPT levels in the control, DMN treated and DMN-RIP-treated rat serum. N; GOT and GPT values in normal animals, DMN/NaCl; GOT and GPT values in the DMN treated hepatic fibrosis animals, DMN/RIP; GOT and GPT values of RIP treatment in the DMN treated hepatic fibrosis animals. \*,  $p < 0.05$ .

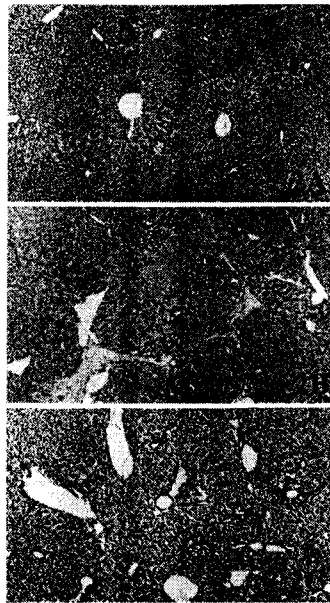


Fig. 2. Photomicrographs of normal(A), DMN-treated(B), and DMN-RIP-treated(C) rat liver, H&E,  $\times 40$ . A, Hepatic cell cords were well-formed radiating from central vein to portal area in the normal liver tissue. Hepatic artery, bile duct, and portal veins were observed in the portal area. B, In the DMN-treated rat liver, hepatic artery, bile duct, and portal veins were not discriminated. The hepatic cells were not formed cell cords, and some of the blood vessels were enlarged. The nodular change of hepatic fibrosis were observed around portal area. C, In the RIP-treated rat liver, the hepatic cell cords and portal area were recovered.

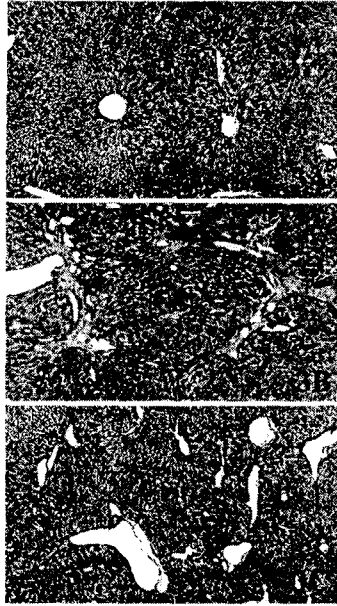


Fig. 3. Photomicrographs of normal(A), DMN-treated(B), and DMN-RIP-treated(C) rat liver, Azan,  $\times 40$ . The connective tissues were stained blue.

A, In the normal liver tissue, the connective tissues were only distributed around some blood vessels(arrow).

B, Amount of connective tissues(blue) was remarkably increased around portal area compared to normal liver tissue. Neighboring portal fibrosis were connected with each other forming fibrotic nodule, but the nodular change was not complete, indicating incomplete septal fibrosis(arrows).

C, The fibrosis were remarkably decreased compared to DMN-treated liver tissue.

## 2) Azan 염색

결합조직의 양을 가늠해 볼 수 있는 Azan 염색으로 각 조직을 비교해 보면 정상군에서는 일부 혈관 주변의 바닥막을 제외하고는 결합조직이 거의 존재하지 않았다(Fig. 3A).

그러나 DMN을 처리한 군에서는 문맥구역을 중심으로 푸른색으로 염색되는 섬유화가 정상에 비해 크게 증가하였다(Fig. 3B). 본 연구의 대부분의 경우에서 섬유화는 이러한 결절의 형태를 보이고 있었는데 완벽한 결절 형태가 아닌 불완전한 경계를 가지는 섬유화(incomplete septal fibrosis)의 형태를 보이고 있었다(Fig. 3B).

그러나 RIP로 치료한 군에서는 DMN 만을 처리한 군에 비해 푸른색으로 염색되는 섬유

화가 크게 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 3C).

## 3. 면역조직화학염색에 의한 간섬유화 치료효과의 판단

DMN에 의한 간섬유화 및 RIP에 의한 간섬유화의 치료효과를 조사하기 위하여 섬유화를 유도하는 성장인자(growth factors)인 TGF- $\beta_1$  과 그 산물인  $\alpha$ -SMA 및 결합조직의 대표적인 표지자(marker)인 vimentin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 하여 그 결과는 Table 1에 요약하였다.



Table 1. TGF-β<sub>1</sub>, α-SMA and vimentin immunoreactivities in the normal, DMN-treated, and DMN-RIP-treated rat livers

	TGF-β <sub>1</sub>			α-SMA			vimentin		
	Normal	DMN	DMN+RIP	Normal	DMN	DMN+RIP	Normal	DMN	DMN+RIP
Hepatocyte	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinusoid	-	-	+	-	+	+	-	-	-
	-	-	++	-	+	+	-	-	-
	-	-	+	-	+	+	-	-	-
	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Central Vein	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	++	-	-	-	-	-	-	-	+
	++	-	-	-	-	-	-	-	+
	++	-	-	-	-	-	-	-	+
Portal area	-	++	+	+	++	+	-	++	+
	-	+	+	+	+++	+	-	+++	++
	-	+++	+	+	++	+	-	+++	+
	-	+	+	+	++	+	-	+++	++
Macrophage-like cells	-	++	+++	-	+++	+++	-	+	+++
	-	++	+++	-	+	++	-	++	++
	-	++	++	-	+	+	-	++	++
	-	+	+++	-	+	+++	-	++	++

-; unstained, +; mildly stained, ++; moderately stained, +++; strongly stained

1) TGF-β<sub>1</sub>

TGF-β<sub>1</sub>에 대한 면역조직화학염색의 결과는 다음과 같다(Table 1).

가) 정상군

정상군의 간세포에서는 TGF-β<sub>1</sub>의 면역반응성(immunoreactivity)을 관찰할 수 없었다. 그러나 TGF-β<sub>1</sub>에서는 중심정맥의 혈관벽에서만 양성반응을 보이고 있었다. 중심정맥을 제외한 나머지 부분에서는 양성반응을 관찰할 수 없었다(Fig. 4A).

나) DMN 처리군

DMN 투여군에서의 간섬유화는 문맥관 주변을 중심으로 확산되는 양상을 보이고 있었

다. 섬유화는 대부분 완벽한 결절의 형태가 아닌 incomplete septal fibrosis의 형태를 보여 주고 있었다. 정상간에서 중심정맥의 혈관벽에서만 나타나던 TGF-β<sub>1</sub>은 문맥관 주변에서 염색이 되었다. 그러나 정상에서 양성반응을 보이던 중심정맥에서는 거의 관찰할 수 없어 섬유화가 중심정맥이 아닌 문맥관 주변에서 집중되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4B).

다) DMN 및 RIP 처리군

2주의 DMN 투여에 이어 4주 동안 RIP를 투여한 군에서는 대조군과 비교하여 간섬유화의 치료가 뚜렷하게 나타났다. 문맥관과 간정맥에 섬유화가 다소 진행된 것을 확인할 수 있었지만 문맥, 간동맥, 및 담관을 뚜렷이 나타

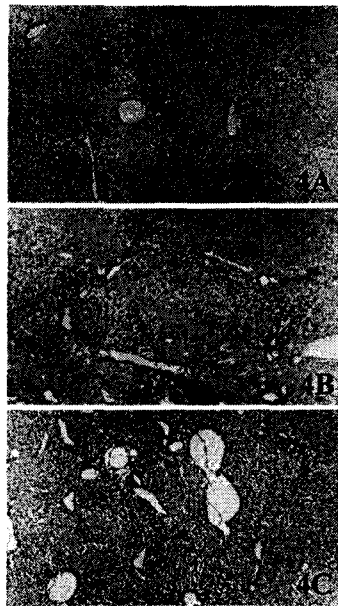


Fig. 4. Photomicrographs of TGF- $\beta_1$ -immunoreactivities in the normal(A), DMN-treated(B), and DMN-RIP-treated(C) rat liver,  $\times 40$ .

A, In normal liver tissue, the TGF- $\beta_1$ -immunoreactivity was only localized in the basement membrane of central vein(arrow).

B, In DMN-treated liver tissue, TGF- $\beta_1$ -immunoreactivity was strongly localized on the portal area forming incomplete septal fibrosis.

C, In RIP-treated liver tissue, TGF- $\beta_1$ -immunoreactivity was decreased compared to DMN-treated rat liver tissue. Mildly staining TGF- $\beta_1$ -immunoreactivity was observed in the sinusoid and portal area.

내고 있어 거의 정상적인 간조직의 모습을 확인할 수 있었다.

문맥관 주변의 TGF- $\beta_1$  역시 많이 줄어들어 있는 것을 확인할 수 있었다. 한편 DMN 처리군에서 관찰되던 문맥관 주변의 대식세포에서의 TGF- $\beta_1$ 은 크게 증가한 것을 확인할 수 있어 간에서의 염증반응은 여전히 활발한 것을 알 수 있었다.

또한 DMN 처리군에서 양성반응을 관찰할 수 없었던 굴모세혈관에서 양성반응이 새로이 출현하는 것을 볼 수 있었다.

그러나 DMN 처리군에서 사라졌던 중심정맥벽에서의 TGF- $\beta_1$ 의 발현은 약하게 회복되고 있었다(Fig. 4C).

## 2) $\alpha$ -SMA

$\alpha$ -SMA에 대한 면역조직화학염색의 결과는 다음과 같다(Table 1).

### 가) 정상군

정상군에서  $\alpha$ -SMA의 면역염색성은 TGF- $\beta_1$ 의 면역염색성과는 차이를 보이고 있었다.  $\alpha$ -SMA 면역염색은 중심정맥이 아닌 문맥관 부위에서 나타나고 있었다. 특히 담즙관에서는 아주 미약한 양성반응을 보이는 반면 문맥 및 간동맥의 벽에서 양성반응을 관찰할 수 있었다. 문맥관 주변을 제외한 나머지 부분에서는 양성반응을 관찰할 수 없었다(Fig. 5A).



Fig. 5. Photomicrographs of  $\alpha$ -SMA immunoreactivities in the normal(A), DMN-treated(B), and DMN-RIP-treated(C) rat liver,  $\times 40$

A, In normal liver tissue,  $\alpha$ -SMA immunoreactivity was only localized on the portal area.

B and C, In both of liver tissues, the immunoreactivities were localized on the sinusoidal wall and portal area. In the portal area, the immunoreactivity was markedly increased on the fibrotic portal area compared to normal tissue.

C, But, in portal area, the immunoreactivity was decreased compared to DMN-treated liver tissue(B). But in the sinusoidal wall, no remarkable change was detected.

#### 나) DMN 처리군

DMN 투여군에서의 강한 섬유화를 관찰할 수 있었다. 정상 간에서 문맥관부위에서만 분포하던  $\alpha$ -SMA의 면역반응성은 문맥관 주변뿐만 아니라 일부 혈관과 굴모세혈관에서도 양성반응을 보이고 있었다. 그러나 정상조직에서 발현이 없던 담즙관에서는 간의 섬유화가 진행되었음에도 불구하고 여전히 양성반응을 관찰할 수 없었다.

또한 강한  $\alpha$ -SMA의 면역반응성을 보이는 문맥 주변에서 대식세포로 생각되는 일부의 세포에서도 강한 양성반응을 보이고 있었다 (Fig. 5B).

#### 다) DMN 및 RIP 처리군

DMN 및 RIP 처리군에서는 거의 정상적인 간조직의 모습을 확인할 수 있었다. 역시 문맥관 주변에서 양성반응을 관찰할 수 있었으나 그 정도는 DMN 처리군에 비해 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다. 굴모세혈관에서의 양성반응은 DMN 처리군에서의 양성반응과 차이를 보이지는 않았다. 또한 담관 역시 양성반응을 보이지는 않았다(Fig. 5C).

#### 3) Vimentin

Vimentin에 대한 면역조직화학염색의 결과는 다음과 같다(Table 1).



Fig. 6. Photomicrographs of vimentin-immunoreactivities in the normal(A), DMN-treated(B), and DMN-RIP-treated(C) rat liver,  $\times 40$

A, No vimentin immunoreactivity was detected in any region.

B, In DMN-treated liver tissue, the immunoreactivity was strongly detected in the fibrotic portal area.

C, In RIP-treated liver tissue, the immunoreactivity was remarkably decreased compared to DMN-treated liver tissue.

#### 가) 정상군

정상군에서 vimentin의 면역반응성은 일부 혈관과 담즙관 등의 주변에서 미약하게 나타날 뿐 확실한 양성반응은 거의 찾을 수 없었다 (Fig. 6A).

#### 나) DMN 처리군

DMN 투여군에서의 강한 섬유화와 함께 섬유화로 인식되는 모든 부위에서 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다. 양성반응은 특히 대부분의 혈관과 쓸개관 등의 주변에서 강하게 발현되고 있었으며 대식세포로 인식되는 세포에서도 비교적 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6B).

#### 다) DMN 및 RIP 처리군

DMN 및 RIP 처리군의 간조직은 거의 정상적인 모습을 보이고 있었다.

역시 문맥관 주변에서 양성반응을 관찰할 수 있었으나 그 정도는 DMN 처리군에 비해 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 담즙관 주변에서 일부의 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 6C). 한편 DMN 처리군에서 관찰되던 문맥관 주변에서 vimentin의 면역반응성은 거의 없어진 것을 확인할 수 있었으며, 대식세포에서 여전히 강한 양성반응이 나타났다.

#### 4) Immunoreactive macrophage-like cells

TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, 및 vimentin 면역조직화학염색의 모두에서 강하게 염색되는 세포들을 관찰할 수 있었다. 이 세포들은 정상군에서는

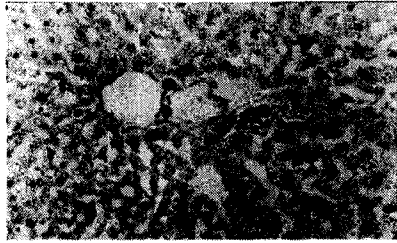


Fig. 7. Macrophage-like cells in the diseased rat liver, ×400  
In the diseased liver tissues(DMN/RIP-treated), macrophage-like cells were detected in the portal area(arrows). These cells were not detected in the normal liver tissue.

발현되지 않았으나 DMN 투여군과 DMN 투여 이후 RIP로 치료한 군에서 강하게 발현되었다 (Fig. 7A, 7B).

또한 이 세포들은 주로 문맥관주변부의 결합조직내에 국한되어 분포하고 있었으며, 다른 부위에서는 관찰할 수 없었다.

#### IV. 논의

간에서 섬유화가 진행될 때 결합조직의 축적에 관여하는 단백질로는 아교질(collagen), extracellular glycoprotein, proteoglycan, elastin 등이 있다(Paizis, Gilbert, Cooper, Murthi, Schembri, Wu, Rumble, Kelly, Tikellis, Cox, Smallwood, & Angus, 2001) 이들 중 collagen은 섬유성세포사이물질의 대부분을 차지하는데 type I 아교질은 섬유화가 형성될 때 많이 생성되며, type III 아교질은 간조직에서 정상적으로 발현되고 있다(Gabele, Brenner, & Rippe 2003). 이들에 의해 간조직에서 결합조직의 양이 증가하게 되면 굴모세혈관에 결합조직이 축적됨으로써 혈관내의 통로가 좁아져 혈액과 간세포간의 물질교환이 원활하게 이루어지지 않는 결과가 된다(Bissell, Friedmann, Maher, & Roll, 1990; Clement, Loreal, Levavasseur, & Guillouzo, 1993; Friedmann, 1990; Shiratori,

Kawase, Shiina, Komatsu, & Omata1993).

간의 섬유화에는 아교질과 함께 직접적인 섬유화의 산물로 분류될 수 있는 desmin, vimentin,  $\alpha$ -SMA, 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein)등의 세포내골격을 형성하는 세포내 단백질의 발현 역시 변하는 것으로 알려져 있다(Cassiman, Libbrecht, Desmet, Deneff, & Roskams, 2002). 이와 함께 Class VI intermediate filament protein인 nestin의 증가를 볼 수 있다(Niki, Pekny, Hellemans, Bleser, Berg, Vaeyens, Quartier, Schuit, & Geerts, 1999). Nestin은 간별세포(hepatic stellate cells)의 활성화에 의해 유도되는데 간별세포에서는 nestin 이외에 vimentin, desmin 등의 결합조직 단백질 발현이 동시에 일어난다(De Bleser, Niki, Xu, Rogiers, & Geerts, 1997). 따라서 간의 섬유화가 일어날 경우 많은 종류의 기질 단백질의 변화를 볼 수 있고 이는 간 섬유화의 지표로 활용될 수 있을 것이다.

한편 간의 섬유화에는 이러한 직접적인 결합조직 단백질 발현의 변화뿐만 아니라 neutrophin, tyrosine kinase, p75(low-affinity nerve growth factor receptor p75) 등의 성장인자의 발현의 변화도 동반된다(Cassiman et al., 2002). 여기에는 혈관형성에 관여하는 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현의 변화도 이루어지고 있고 VEGF의 발현의 변화는 섬유화 기질의

대부분을 차지하는 collagen type I의 발현과 연관되어 있다는 점은 간경변 치료 방법의 연구에 주목해야 할 점으로 여겨진다(Corpechot, Barbu, Wendum, Kinnman, Rey, Poupon, Housset, & Rosmorduc, 2002). 또한 epidermal growth factor(EGF) 및 그 수용체의 발현의 변화가 간세포의 배양에서 간세포의 증식에 관여하고 있다(Komuves, Feren, Jones, & Fodor, 2000).

이외에도 간조직에 염증 등의 자극이 가해질 경우 나타나는 결합조직의 증가는 hepatocyte growth factor(Hata et al., 2002), transforming growth factor-beta(TGF- $\beta$ ), NGF(nerve growth factor), 및 BDNF(brain-derived nerve growth factor) 등 많은 종류의 cytokine들에 의해서도 이루어지는 것으로 알려져 있다(Cassiman et al., 2002; Ikeda, Wu, & Wu, 1993). 이들 중 hepatocyte growth factor는 강력하게 간세포 증식을 촉진하는 물질로 특히 간의 손상이 진행되는 동안에 발현되는 것으로 알려져 있다(Hata, Ikeda, Uno, & Asano, 2002). 그러나 Masson 외 10인(1999)은 간경변 후 간의 재생에는 cyclins, thymidine kinase, interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor-alpha 등의 발현의 변화가 관여하며 hepatocyte growth factor(HGF)의 변화는 덜한 것으로 보고하고 있어 간조직에서의 결합조직의 형성에는 다양한 인자들의 상호 작용이 관여되고 있음을 알 수 있다.

한편 이들 성장인자 중 transforming growth factor-beta(TGF- $\beta$ )는 가장 강력한 fibrogenic cytokine으로 간뿐만 아니라 폐(lung), 신장(kidney), 피부(skin), 심장(heart), 및 동맥의 벽(arterial wall)을 포함하는 많은 vital organs 및 조직의 섬유조직증식에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Armendariz-Borunda, Katai, Jones, Seyer, Kang, & Raghov, 1993; Friedman, Yamasaki, & Wong, 1994; Nakamura, Sakata, Ueno, Sata, & Ueno, 2000). 한편 간의 손상이 진행될 경우에 TGF- $\beta$ 는 hepa-

cyte growth factor와 함께 간에서 colocalization 되며 두 가지 성장인자의 분비량은 간의 손상과 직접적인 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Hata et al., 2002).

이러한 TGF- $\beta$ 는 다섯 종류(포유류에서는 세 가지)가 보고되고 있으나, TGF- $\beta_1$ 이 fibrogenic cytokine으로 많이 연구되고 있다(Bissell, Wang, Jarnagin, & Roll, 1995; Milani, Herbst, Schuppan, Stein, & Surrenti, 1991). TGF- $\beta_1$ 은 간이 lipocyte를 myofibroblast-like cell로 변성시킴에 따라 세포외기질단백질의 합성유도 및 분해저해 작용을 한다고 보고되고 있다(Ueki, Kaneda, Tsutsui, Nakanishi, Sawa, Morishita, Matsumoto, Nakamura, Takahashi, Okamoto, & Fujimoto, 1999). 특히 TGF- $\beta$  family의 한 종류로 알려진 activin 및 inhibin의 발현은 간의 섬유화에 직접적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다(De Bleser et al., 1997).

위의 사실은 종합해 보면 TGF- $\beta_1$ 이 간세포의 증식 및 세포외기질의 증식 모두에 key regulator로 작용하고 있음을 말해 주는 것이다. 따라서 실험동물에서 간경변 등 간의 손상이 진행될 경우에 anti-TGF- $\beta_1$  antibody를 투여하면 동물의 생존율을 높일 수 있다는 사실을 알 수 있다. 실제로 Ohara와 Kusano(2002)는 간경변 흰쥐 모델에서 TGF- $\beta_1$ 의 길항제를 투여하여 간의 재생율을 높이고 생존율을 증가시킨 결과를 보고하였다.

따라서 간경변 치료 및 간의 재생을 위한 방법은 간의 섬유화에 나타나는 단백질들의 생성을 차단하는 일과 많은 종류의 성장인자들을 차단하는 것으로 귀결될 수 있다.

본 연구에서도 흰쥐를 모델로 오랫동안 한방에서 간질환의 치료제로 사용된 황백나무(Phe-llo-dendron amurense)와 마타리풀(Patrinia scabiosaefolia)로 부터 추출된 혼합물인 RIP가 간 섬유화 억제효과가 있는지를 확인하기 위해 간 섬유화를 유도하는 성장인자인 TGF- $\beta_1$ 과 그

산물인  $\alpha$ -SMA 및 결합조직의 대표적인 표지자인 vimentin에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 우선 TGF- $\beta_1$ 은 정상 간조직에서는 중심정맥의 벽에서만 양성반응을 보이고 있어 이는 섬유화의 촉진을 위한 발현이 아닌 정상적인 TGF- $\beta_1$ 의 면역반응성으로 생각된다. 한편 DMN 투여군에서의 간섬유화는 문맥관 주변을 중심으로 확산되는 양상을 보이고 있었다.

DMN은 간에서 formaldehyde, methanol, 및 알킬성 중간물질들로 분해된 후 핵산 또는 단백질들과 결합하여 메틸화된 거대분자로 변하고 결국에는 간세포의 피사 및 간조직에서 collagen과 같은 섬유성기질단백질들의 침착을 야기시킨다(Friedmann et al., 1993; George & Chandrakasan, 1996).

본 연구에서 DMN 처리군에 비해 RIP 치료군에서는 Azan 염색 등에서 섬유화가 확연히 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 특히 RIP 치료군에서 DMN 처리군에 비해 문맥관 주변의 TGF- $\beta_1$ 의 면역반응성은 현저히 감소되었다. 이러한 결과는 RIP 투여가 TGF- $\beta_1$  발현의 감소를 통하여 섬유 증식이 줄어든 것이라 사료된다.

한편  $\alpha$ -SMA은 간세포에 자극이 있을 경우 간별세포에서 분비되어 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는  $\alpha$ -SMA 발현의 감소는 문맥관 주변에서 확연하게 나타났으나 간별세포가 존재하는 쿨모세혈관 부위에서는 그 발현의 차이를 확인할 수 없었다. 이러한 현상은  $\alpha$ -SMA의 발현이 간손상에 덜 민감하게 반응하는 것이라 판단되며 추후 지속적인 관찰이 더 필요할 것으로 보인다.

본 연구의 정상군에서 vimentin의 면역반응성은 일부 혈관 및 담즙관의 주변에서 미약하게 나타날 뿐 확실한 양성반응은 거의 찾을 수 없었으나 DMN 처리군에서는 섬유화와 함께 동시에 그 발현의 변화가 나타나고 있었다. 따라서 vimentin의 변화는 간섬유화 및 그 치

료의 지표로 충분히 활용될 수 있을 것이다.

이러한 사실로 미루어 최근 간의 섬유화와 관련하여 많은 종류의 치료법이 동원되고 있다. 특히 그 동안 한방이나 민간에서 간질환의 치료에 효과가 있는 것으로 알려진 물질들을 대상으로 그 치료효과를 평가하려는 많은 연구가 이루어지고 있다. 오미자(Schizandrae Fructus)로부터 분리된 Schizandrin C의 합성동족체인 biphenyl dimethyl dicarboxylate(DDB)는 상승된 트랜스아미나제(transaminase) 값을 하강시키는 효과가(Nan et al., 2000)있고, 또한 Lycium chinense fruit에서 추출된 Zeaxanthin dipalmitate 역시 간 섬유화를 줄이는데 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(Kim et al., 2002). 또한 Kang, Kim, Kim, & Kim (2002)은 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione(oltipraz)와 dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate(DDB) 등이 간의 섬유화를 억제한다고 하였다. 이외에도 Di Sario 외 12인 (2002)은 pirfenidone이 간의 stellate cell의 증식과 collagen 합성을 저해하여 간의 섬유화를 억제하는 효과가 있음을 보고하고 있다.

본 연구에서도 한방에서 간질환의 치료제로 사용된 황백나무(Phellodendron amurense)와 마타리풀(Patrinia scabiosaefolia)로 부터 추출된 혼합물인 RIP가 간섬유화 억제효과가 있는지를 실험 연구한 결과 간섬유화가 확연히 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 한방이나 대체요법의 천연물로부터의 간치료제는 오랜 세월 임상적인 효력이 어느 정도 확보되어 있다는 점에서 그 약효 및 부작용 등에 대한 깊이 있는 연구가 진행될 경우에 치료제로서의 활용이 충분히 가능하리라 본다.

## V. 결론 및 제언

본 연구에서는 오랫동안 한방에서 간질환의 치료제로 사용된 황백나무(*Phellodendron amurense*)와 마타리풀(*Patrinia scabiosaefolia*)로부터 추출된 혼합물인 RIP의 간섬유화 진행에 대한 억제효과를 살펴보고자 하였다.

연구를 위하여 일반적인 조직상태의 파악을 위해서는 H & E 염색을, 간섬유화의 정도를 파악하기 위해서는 Azan 염색을 시행하였다. 또한 간 섬유화의 지표를 보여 주는 객관적인 marker로서 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA 및 결합조직에서 specific한 발현을 보이는 intermediate filament인 vimentin의 발현을 면역조직화학염색으로 동정하여 간섬유화의 치료 정도를 객관화하려 하였다. 그리고 GOT, GPT의 수준을 조사하여 섬유화에 따른 간세포 파괴의 정도를 파악하였다.

본 연구에서의 실험동물은 모두 세 군으로 설정하였다. 정상군은 생리식염수를 주사한 군으로 하였으며, 간섬유화를 유발시키기 위한 DMN 투여군을 질병군으로, 간섬유화의 치료를 위한 RIP 투여군을 치료군으로 설정하였으며 실험 결과는 다음과 같다.

본 연구에서는 일반적인 형태를 보기 위한 H & E 염색을 시행하여 정상 간조직과 DMN에 의해 간의 섬유화가 진행된 상태를 확연히 구분할 수 있었다. 또한 RIP의 치료에 의해 중심정맥을 향한 간세포줄이 나타나기 시작하는 등의 정상적인 간의 모습이 재현됨을 확인할 수 있었다. 또한 섬유화 정도를 파악하기 위한 Azan 염색을 시행하여 섬유화된 부분을 파란색의 특이한 색깔로 나타내게 함으로써 간경변의 양적인 변화를 뚜렷이 알 수 있었다.

본 연구에서는 대부분 완벽한 결절의 형태가 아닌 incomplete septal fibrosis의 형태를

보여 주고 있다. 따라서 완벽한 형태의 간경변이 아닌 incomplete septal fibrosis의 상태에서 모든 실험을 진행하였다. 그러나 후속 실험에서는 완벽한 형태의 간경변을 유도하여 RIP의 치료효과를 검증할 필요가 있을 것이다.

한편 DMN에 의한 간섬유화 및 RIP에 의한 간섬유화의 치료효과를 객관적으로 평가하기 위하여 섬유화를 유도하는 성장인자인 TGF- $\beta_1$ 과 그 산물인  $\alpha$ -SMA 및 결합조직의 대표적인 표지자인 vimentin에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. 우선 TGF- $\beta_1$ 은 정상군에서는 중심정맥의 벽에서만 양성반응을 보였고, DMN 투여군에서의 간섬유화는 문맥관 주변을 중심으로 확산되는 양상을 보였다.

DMN 처리군에 비해 RIP 치료군에서는 앞선 Azan 염색 등에서 섬유화가 확연히 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 특히 RIP 치료군에서 DMN 처리군에 비해 문맥관 주변의 TGF- $\beta_1$ 의 면역반응성은 현저히 감소되었다.

한편  $\alpha$ -SMA발현의 감소는 문맥관 주변에서 확연하게 나타났으나 간별세포가 존재하는 굴모세혈관 부위에서는 그 발현의 차이를 확인할 수 없었다.

정상군에서 vimentin의 면역반응성은 일부 혈관 및 담즙관의 주변에서 미약하게 나타날 뿐 확실한 양성반응은 거의 찾을 수 없었으나 DMN 처리군에서는 섬유화와 함께 동시에 그 발현의 변화가 나타나고 있었다. 따라서 vimentin의 변화는 간섬유화 및 그 치료의 지표로 충분히 활용될 수 있을 것이다.

이상과 같은 결과로써 DMN에 의해 유도된 간의 섬유화는 RIP의 치료에 의해 완화되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 섬유화의 변화에 따라 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, 및 vimentin의 면역반응성이 부위에 따라 차이를 보이며 변화하는 것을 확인할 수 있었다.

한편 정상군을 제외한 질병군의 조직에서는 결합조직의 형성이 가장 왕성한 문맥주변에서



모두 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, 및 vimentin의 항체에 강한 양성반응을 보이는 큰 세포들을 관찰할 수 있었다. 향후 이 세포들의 정체를 밝히는 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

## 참고문헌

- Armendariz-Borunda, J., Katai, H., Jones C. M., Seyer, J. M., Kang, A. H., & Raghov, R.(1993). Transforming growth factor beta gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after carbon tetrachloride treatment. Lab Invest, 69(3), 283-294.
- Berghaus, T. M., & Beuers, U.(2001). Alcoholic and non-alcoholic fatty liver hepatitis. When is abstaining from alcohol enough, when do steroids help?. MMW Fortschr Med, 143(26-27), 28-32.
- Bissell, D. M., Friedmann, S. L., Maher, J. J., & Roll, F. J.,(1990). Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. Hepatology, 11(3), 488-498.
- Bissell, D. M., Wang, S. S., Jamagin, W. R., & Roll, F. J.,(1995). Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver: evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. J Clin Invest, 96(1), 447-455.
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Desmet, V., Deneff, C., & Roskams, T.(2002). Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. J Hepatology, 36(2), 200-209.
- Clement, B., Loreal, O., Levavasseur, F., & Guillouzo, A.(1993). New challenges in hepatic fibrosis. J Hepatology, 18(1), 1-4.
- Corpechot, C., Barbu, V., Wendum, D., Kinnman, N., Rey, C., Poupon, R., Housset C., & Rosmorduc, O.(2002). Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. Hepatology, 35(5), 1010-1021.
- De Bleser, P. J., Niki, T., Xu, G., Rogiers, V., & Geerts, A.(1997). Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver. Hepatology, 26(4), 905-12.
- Di Sario, A., Bendia, E., Svegliati, Baroni, G., Ridolfi, F., Casini, A., Ceni, E., Saccomanno, S., Marziani, M., Trozzi, L., Sterpetti, P., Taffetani, S., & Benedetti, A.(2002). Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production. J Hepatology, 37(5), 584-591.
- Friedman, S. L.(1990). Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. Sem Liv Dis, 10(1), 20-29.
- Friedman, S. L.(1993). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med, 24, 328(25), 1828-1835.
- Friedman, S. L., Yamasaki, G., & Wong, L.(1994). Modulation of transforming growth factor beta receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response: enhanced binding and reduced gene expression accompany cellular activation in culture and in vivo. J Biol Chem, 269(14), 10551-10558.
- Gabele, E., Brenner, D. A., & Rippe, R. A.(2003). Liver fibrosis : Signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. Front Biosci, 8, d69-77.
- Gentilini, P., Laffi, G., La Villa, G., Romanelli, R. G., & Blendis, L. M.(1999). Ascites and hepatorenal syndrome during cirrhosis. J Hepatology, 31(6),1088-1097.
- George, J., & Chandrakasan, G.(1996). Glycoprotein metabolism in dimethylnitrosamine induced hepatic fibrosis in rats. Int J Biochem Cell Biol, 28(3), 353-361.

- Giannattasio, F., Salvio, A., Varriale, M., Picciotto, F. P., Di Costanzo, G. G., & Visconti, M.(2002). Three cases of severe acute hepatitis after parenteral administration of amiodarone: the active ingredient is not the only agent responsible for hepatotoxicity. Ann Ital Med Int. *17*(3), 180-184.
- Hata, J., Ikeda, E., Uno, H., & Asano, S.(2002). Expression of Hepatocyte Growth Factor mRNA in Rat Liver Cirrhosis Induced by N-nitrosodimethylamine as Evidenced by In Situ RT-PCR. J Histochem Cytochem. *50*(11),1461-1468.
- Hsu, Y. C., Chiu, Y. T., Lee, C. Y., Lin, Y. L., & Huang, Y. T.(2004). Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. J Biomed Sci. *11*(3), 408-417.
- Ikeda, H., Wu, G. Y., & Wu, C. H.(1993). Lipocytes from fibrotic rat liver have an impaired feedback response to procollagen propeptides. Am J Physiol. *264*(1), G157-162.
- Johnson, P. J.(1993). Hepatitis viruses, cirrhosis, and liver cancer. J Surg Oncol Suppl. *3*, 28-33.
- Kang, K. W., Kim, Y. G., Kim, C. W., & Kim, S. G.(2002). The anti-fibrogenic effect of a pharmaceutical composition of [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione] (oltipraz) and dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl- 2,2'-dicarboxylate(DDB). Arch Pharm Res. *25*(5), 655-663.
- Kaye, G., & Pawlina, W.(2003). Histology A Text and Atlas, 4th Ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 52.
- Kim, H. P., Lee, E. J., Kim, Y. C., Kim, J., Kim, H. K., Park, J. H., Kim, S. Y., & Kim, Y. C.(2002). Zeaxanthin dipalmitate from Lycium chinense fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats. Biol Pharm Bull. *25*(3), 390-392.
- Komuves, L. G., Feren, A., Jones, A. L., & Fodor, E.(2000). Expression of epidermal growth factor and its receptor in cirrhotic liver disease. J Histochem Cytochem. *48*(6), 821-830.
- Kusunose, M., Qiu, B., Cui, T., Hamada, A., Yoshioka, S., Ono, M., Miyamura, M., Kyotani, S., & Nishioka, Y.(2002). Effect of Sho-saiko-to Extract on Hepatic Inflammation and Fibrosis in Dimethylnitrosamine Induced Liver Injury Rats. Biol Pharm Bull. *25*(11), 1417-1421.
- Masson, S., Scotte, M., Francois, A., Coeffier, M., Provot, F., Hiron, M., Teniere, P., Fallu, J., Salier, J. P., & Daveau, M.(1999). Changes in growth factor and cytokine mRNA levels after hepatectomy in rat with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis. Am J Physiol. *277*(4), G838-G846.
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Stein, H., & Surrenti, C.(1991). Transforming growth factors beta1 and beta2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. Am J Pathol. *139*(6), 1221-1229.
- Nakamura, T., Sakata, R., Ueno, T., Sata, M., & Ueno, H.(2000). Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine- treated rats. Hepatology. *32*(2), 247-255.
- Nan, J. X., Park, E. J., Kim, H. J., Ko, G., & Sohn, D. H.(2000). Antifibrotic effects of the methanol extract of Polygonum aviculare in fibrotic rats induced by bile duct ligation and scission. Biol Pharm Bull. *23*(2), 240-243.
- Niki, T., Pekny, M., Hellemans, K., Bleser P. D., Berg, K. V., Vaeyens, F., Quartier, E., Schuit, F., & Geerts, A.(1999). Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. Hepatology. *29*(2), 520-527, Comment in: Hepatology. *29*(2), 602-603.
- Ohara, K., & Kusano, M.(2002). Anti-transforming growth factor-beta1 antibody improves survival rate following partial hepatectomy in cirrhotic rats. Hepatology Res. *24*(2), 174.
- Paizis, G., Gilber, R. E., Cooper, M. E., Murthi, P., Schembri, J. M., Wu, L. L., Rumble, J. R., Kelly, D. J., Tikellis, C., Cox, A., Smallwood, R. A., & Angus, P. W.(2001). Effect of angiotensin II type 1 receptor

- blockade on experimental hepatic fibrogenesis. J Hepatol, 35(3), 376-385.
- Sherlock, S., & Dooley, J.(1997). Diseases of the liver and biliary system 10th edition. Blackwell Science, 371-373.
- Shiratori, Y., Kawase, T., Shiina, S., Komatsu, Y., & Omata, M.(1993). Role of hepatic sinusoidal cells in hepatic injury and fibrosis in the liver. Gastroenterol Japonica, 28(4), 102-106.
- Stewart, S., Jones D., & Day, C. P.(2001). Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies. Trends Mol Med, 7(9), 408-413.
- Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E., & Fujimoto, J.(1999). Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. Nat Med, 5(2), 226-230.
- Weng, H. L., Cai, W. M., & Liu, R. H.(2001). Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. World J Gastroenterol, 7(1), 42-48.