

茵陳清肝湯이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향

이홍일, 김영철, 우홍정, 이장훈
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Inhibitory Effect of *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*) on Fibrogenesis of Rat Hepatic Stellate Cells

Hong-ri Lee, Young-chul Kim, Hong-jung Woo, Jang-hoon Lee
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-hee University

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate the anti-fibrogenic effect of *Injinchunggan-tang* on cultured rat hepatic stellate cells.

Materials and Methods : Hepatic stellate cells(HSC-T6) were treated with various concentrations of *Injinchunggan-tang* extract for 24, 48, and 72 hours. The extraction was done with distilled water. After the treatment, cell viability, proliferation, procollagen levels and the mRNA of the TIMP-1, TIMP-2, and ASMA were measured by using MTT assay, BrdU assay, procollagen type I C-peptide EIA kit and RT-PCR.

Results : The proliferation, mRNA expression and synthesis of collagen of the hepatic stellate cells were inhibited by *Injinchunggan-tang* treatment in a dose-dependent manner. This indicates the prescription has inhibitory effect on fibrogenesis of the liver by regulating the fibrogenesis associated genes in transcription. Cell viability was inhibited in time- and dose-dependent manners. It seemed that the drug should be used with sufficient dose to acquire treatment effect.

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

Key words : *Injinchunggan-tang*(*Yinchenqinggan-tang*), liver cirrhosis, liver fibrosis, Hepatic Stellate Cell(HSC), HSC-T6.

1. 서론

2007년 대한민국 사망원인통계에 의하면 전체 사망률에 있어 간질환에 의한 사망이 8위를 차지하고 있으며 남성에서는 5위 여성에서는 10위를 차지하고 있다. 특히 4~50대에서 간암에 의한 사망률은 1위로 높게 나타나고 있다¹.

일반적으로 만성 간질환, 간암은 대부분 간 섬유화를 동반하게 되고 최근 생활수준의 제고로 말미암아 발병률이 상승하고 있는 지방성간염도 적절한 치료가 없으면 간섬유화를 거쳐 간경화에까지 이르게 된다. 그리고 기타 간질환, 예하면 약물성 간질환, 대사성간질환, 자가면역성간질환 혹은 주혈흡충증 등도 간섬유화와 관련이 있다.

최근 실험연구를 통하여 간섬유화과정의 기전이 점차 밝혀지고 있고, 섬유화 억제 및 치료에 관한 약물의 탐색²⁻⁶이 시도되고 있으나 사람에게 직접 투여하여 효과를 기대하기는 미흡한 실정이다.

· 교신저자: 김영철 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120
E-mail: yekim@khmc.or.kr

비실질세포 중에서도 간경화에 보다 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)는 자극을 받으면 활성화하고 증가하며, 콜라겐을 포함한 다양한 세포외기질 물질을 합성하고 분비하게 되고⁷⁻⁹, 이렇게 간소엽 전체에 광범위하게 축적된 콜라겐은 혈류의 흐름과 간세포의 물질교환 등을 방해하게 되어 섬유화를 진행시키게 된다.

茵陳清肝湯은 임상연구에서 慢性B型肝炎 환자의 손상된 간 기능의 개선¹⁰, 실험적 연구에서 급성 및 아급성, 만성 경구독성실험에서 약물의 안전성¹¹, TGF-β1 합성의 억제, fibroblast의 증식과 섬유화 유발 유전자 발현에 대한 억제¹², kupffer cell에서의 inflammatory cytokine 발현에 대한 억제¹³, CCl₄로 肝硬變症을 유발한 흰쥐에 대하여 肝機能恢復 및 肝組織의 纖維化 抑制作用이 뚜렷함¹⁴ 등 보고가 있다. 그러나 간성상세포에 茵陳清肝湯을 직접 처리한 예는 없는 상황이다.

본 연구에서는 간성상세포에 茵陳清肝湯을 처리하여 MTT Assay 와 BrdU Assay, Procollagen Assay, RT-PCR을 시행하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에서 사용한 약재는 대한약전의 한약규격집¹⁵에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 아래와 같다.

Prescription of *Injinchunggan-tang*

Herb	Scientific Name	Volume (g)
茵 陳	Artemisiae Capillaris Herba	50
地 榆	Sanguisorbae Radix	15
白 朮	Atractylodis Macrocephalae Rizhoma	12
茯 苓	Hoelen	12
豬 苓	Polyporus	12
覆盆子	Rubi Fructus	12
生 薑	Zingiberis Rhizoma	12
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	8
蘿菔子	Raphani Semen	8
青 皮	Aurantii Pericarpium	6
甘 草	Glycyrrhizae Radix	6
Total amount		153

2) 검액의 조제

茵陳清肝湯 5첩 분량(765g)을 round bottomed flask에 넣고 3.0 liter의 증류수를 더하여 관류 냉각장치 하에서 2시간 동안 전탕하였다. 이를 상온에서 식힌 후 whattmann paper를 통과시켜 여과한 다음 여과용액을 rotary evaporator에서 감압 농축하였다. 농축용액을 동결 건조시켜 분말 상태의 추출물 87.5g(收率:11%) 얻었다. 이 추출물을 세포 배양액에 100 mg/ml의 농도로 녹이고 0.22 μm syringe filter를 이용하여 멸균한 다음 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

3) 시 약

Fetal Bovine Serum(FBS), Dulbecco's Modified Eagle Mmedium (DMEM), antibiotics 등은 Gibco사(CA, USA), n-Propanol, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 등은 Sigma사(MO, USA), 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III(BrdU Kit)는 Roche사(Mannheim, Germany), Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit는 TaKaRa사(Shiga, Japan), RNeasy Mini Plus Kit는 Qiagen사(CA, USA), Taq DNA polymerase는 Bioneer사(Deajoen, Korea),

Reverse transcription-polymerase reaction chain (RT-PCR) System은 Promega사(WI, USA) 등의 제품을 사용하였고, 기타 plasticwares는 SPL사(Korea) 제품을 이용하였다.

2. 방법

1) Cell culture

쥐의 간 성상세포인 HSC-T6 (kind gift of Dr. Scott L. Friedman)을 이용하였다. 세포는 10%FBS, 1%penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM배지를 사용하였고 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다.

2) 약제처리

2%FBS, 1%penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM배지에 약제를 필요한 농도로 희석하여 처리하였다.

3) 세포활성 측정(MTT Assay)

24-well plate에 HSC-T6 cell을 분주하고 24시간 동안 배양한 후 각각 0 µg/ml, 31.25 µg/ml, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml의 농도로 약제를 처리하고 24시간, 48시간, 72시간별로 MTT assay를 하였다. 즉 MTT powder를 2 mg/ml의 비율로 DMEM에 희석하여 MTT solution을 만들고 각 well에 200 µl의 MTT solution을 넣고 45분 동안 incubator에서 배양하였다. Medium을 제거하고 각 well에 100 µl의 n-propanol을 넣은 후 5-10분간 흔들어서 세포를 충분히 녹였다. 각 well에서 용액을 50 µl씩 추출하여 96-well plate로 옮긴 후 ELISA Reader로 570 nm파장으로 흡광도를 측정했다.

4) 세포증식능력 측정(BrdU Assay)

96-well plate에 세포를 분주하고 24시간 후 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml의 농도로 약제처리를 하고 각각 24시간, 48시간, 72시간 후에 BrdU Assay를 하였다. 즉 각 well에 BrdU labeling solution을 추가하고 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 4시간 배양하였다. Culture medium

을 제거하고 washing medium을 넣어 세포를 씻어낸 후 pre-cooled fixative를 넣고 세포를 -15 ~ -25 °C의 온도에서 30분간 고정시켰다. Fixative를 제거하고 washing medium을 넣어 세포를 씻어낸 후 nucleases working solution을 넣고 37°C의 waterbath에서 30분간 배양하였다. Nucleases working solution을 제거하고 wash medium을 넣고 세포를 씻어낸 후 anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution을 넣고 incubator에서 30분간 배양하였다. Antibody conjugate를 제거하고 washing buffer를 넣어 세포를 씻어낸 후 peroxidase substrate를 넣은 후 반응 양성 샘플들이 초록빛을 나타낼 때까지 빛을 차단한 상태로 샘플들을 배양하였다. 490 nm의 참조 파장에서 405 nm의 파장에서 microplate reader로 샘플들의 흡광도를 측정하였다.

5) 역전사 중합효소 반응(RT-PCR)

(1) RNA 추출

6-well plate에 HSC-T6 cell을 분주하고 다음날 각 plate에 0 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml의 농도별로 약제를 처리한 후 24시간, 48시간, 72시간별로 Qiagen사의 RNeasy Mini Plus Kit를 이용하여 RNA를 분리 하였다.

(2) Complementary DNA(cDNA) 합성

Promega사의 Reverse Transcription System을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

즉 1 µg의 RNA를 DEPC-처리된 증류수에 10 µl 되게 조정하여 70°C에서 5분간 가열한 후 얼음에 5분간 두었다. 2 µl의 10× reaction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 4 µl의 25 mM MgCl₂, 2 µl의 10 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.5 µl (40 unit/µl)의 ribonuclease (RNase) inhibitor, 15 unit의 AMV reverse transcriptase (Promega, WI, USA)를 가하여 최종량을 20 µl로 하였다. 반응조건은 42°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 4°C에서 5분간으로 하여 반응시켰다. 합성된 cDNA는 -80°C에 보관하였으며 필요할 때마다 사용하였다.

(3) Primer 제작
House keeping gene으로는 GAPDH를 사용하였고, target gene으로는 Alpha Smooth Muscle

Actin(ASMA), Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP-1, TIMP-2) gene을 사용하였으며 각 primer 의 sequence는 다음과 같다.

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

Gene	Primer	Sequence	Cycle No.	Product size
TIMP1	sense	5'- GCC TAC ACC CCA GCC AT -3'	30	138
	antisense	5'- ATG CCA GGG AAC CAG GAA GC -3'		
TIMP2	sense	5'-GGC AAC CCC ATC AAG AGG ATT CAA T-3'	32	107
	antisense	5'- CAC ACT GCT GAG GAG GGG -3'		
ASMA	sense	5'- GTC GGG ACC TCA CTG ACT ACC -3'	26	126
	antisense	5'- CAA AAT CCA GGG CGA CAT AAC ACA G -3'		
GAPDH	sense	5'- GGC ATC GTG GAA GGG CTC AT -3'	21	120
	antisense	5'- AGG GAT GAT GTT CTG GGC TGC -3'		

(4) PCR
PCR의 방법은 2 µl의 cDNA에 5 µl의 10× PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 4 µl의 dNTP, 20 pmol의 sense와 antisense 시발체(primer), 2 unit의 Taq DNA polymerase를 넣고 멸균된 증류수로 총 volume이 50µl가 되도록 조정하였다. PCR 조건은 유전자증폭기(Biometra, Gottingen, Germany)를 이용하여 초기변성(denaturation)은 95°C로 5분간 시행한 후 풀림(annealing)은 55°C에서 1분간, 연장(extension)은 72°C에서 1분간 하고, 이후 각 유전자를 25~31 cycle로 증폭하였으며 마지막 cycle의 연장은 72°C에서 2분간 시행하였다. 10 µl의 PCR 생성물에 2 µl의 6× gell loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% sucrose)을 혼합하여 0.5 µg/ml의 ethidium bromide 가 첨가된 2% 한천 gel에 0.5× TBE(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 이용하여 90 volt로

1시간 동안 전기영동을 하였으며 Gel Doc 1000 gel documentation system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 띠(band)를 확인하였다.

6) Procollagen Type I C-Peptide(PIP) EIA
Procollagen Type I C-peptide EIA Kit를 사용하였으며 제작사의 지시에 따라 시행하였다.

7) 통계처리
Microsoft사의 Excel program을 이용하여 T-test를 수행하였으며, p<0.05인 경우를 유의성이 있는 것으로 보았다.

III. 결 과

1.茵陳清肝湯이 간 정상세포 활성화에 미치는 영향 (MTT Assay)

茵陳清肝湯은 고농도 투여군(250, 500µg/ml)에서는 농도 의존적으로 세포 활성을 억제하였다 (Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of *Injinchunggan-tang* on HSC-T6 Cell Viability(MTT Assay)

time(hour)	conc.	0 μ g/ml	31.25 μ g/ml	62.5 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml
24		0.145 \pm 0.002	0.151 \pm 0.009	0.152 \pm 0.005	0.147 \pm 0.007	0.144 \pm 0.010	0.134 \pm 0.011
48		0.466 \pm 0.012	0.486 \pm 0.002	0.489 \pm 0.009	0.473 \pm 0.004	0.439 \pm 0.010	0.227 \pm 0.007**
72		1.039 \pm 0.010	1.015 \pm 0.008	0.996 \pm 0.035	0.969 \pm 0.008*	0.931 \pm 0.013*	0.355 \pm 0.001***

Values represent O.D.(optic density) of each samples(mean \pm SD).

P values compared with the none treated

*) P< 0.05

**) P< 0.01

***) P< 0.001

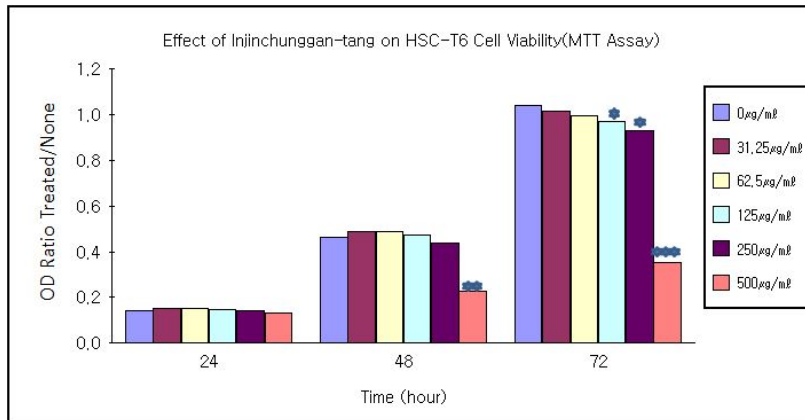


Fig. 1. Effect of *Injinchunggan-tang* on HSC-T6 cell viability assessed by MTT assay.

Results show that IJCGT has inhibitory effect on stellate cell viability in high-concentration group with dose-dependent manner. (*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001)

2.茵陳清肝湯이 간성상세포 증식에 미치는 영향 (BrdU Assay)

茵陳清肝湯이 간성상세포의 증식에 미치는 영향을 확인해보기 위해, BrdU assay를 한 결과 약제의 농도의존적인 억제효과가 나타났고, 특히 고농도 투여군(200, 400 μ g/ml)에서 뚜렷하였다(Table 2, Fig. 2).

3.茵陳清肝湯이 간섬유화 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (RT-PCR)

茵陳清肝湯투여에 의하여 ASMA, TIMP-1, 유전자의 발현이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었으며 TIMP-2 유전자의 발현은 72시간 투여군에서 농도의존적인 억제경향이 관찰되었다(Table 3, Fig. 3).

Table 2. Effect of *Injinchunggan-tang* on HSC-T6 Cell Proliferation (BrdU Assay)

time(hour) \ conc.	0 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	200 μ g/ml	400 μ g/ml
24	1.867 \pm 0.022	1.768 \pm 0.132	1.655 \pm 0.052**	1.557 \pm 0.110*	1.462 \pm 0.022***
48	1.610 \pm 0.054	1.517 \pm 0.102	1.445 \pm 0.057***	1.398 \pm 0.063***	1.3146 \pm 0.126**
72	1.342 \pm 0.051	1.089 \pm 0.066**	0.964 \pm 0.048***	0.733 \pm 0.014***	0.667 \pm 0.025***

Values represent O.D.(optic density) of each samples(mean \pm SD).

P values compared with the none treated

*) p<0.05

**) p<0.01

***) p<0.001

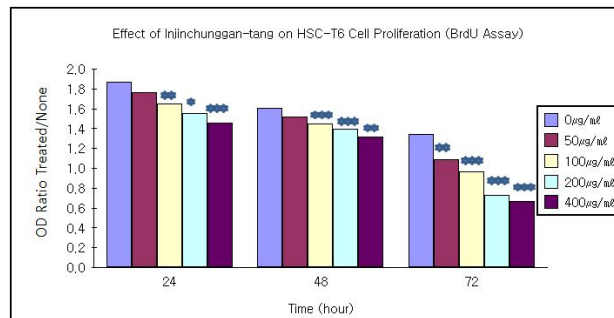


Fig. 2. Effect of IJCGT on HSC-T6 cell proliferation assessed by BrdU Assay.

Results show that IJCGT has inhibitory effect on stellate cell proliferation with dose-dependent manner.(*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001)

Table 3. Effect of *Injinchunggan-tang* on HSC-T6 Cell's gene expression

gene \ conc.	24h-0 μ g/ml	24h-50 μ g/ml	24h-200 μ g/ml	24h-400 μ g/ml
ASMA	1.040462	0.954802	0.983051	0.934783
TIMP1	0.976879	0.858757	0.853107	0.777174
TIMP2	1.132948	1.146893	1.056497	1.103261

gene \ conc.	48h-0 μ g/ml	48h-50 μ g/ml	48h-200 μ g/ml	48h-400 μ g/ml
ASMA	1.029877	1.017647	1.027946	0.980336
TIMP1	0.930962	0.923529	0.951145	0.973511
TIMP2	1.239343	1.211765	1.228809	1.263009

gene \ conc.	72h-0 μ g/ml	72h-50 μ g/ml	72h-200 μ g/ml	72h-400 μ g/ml
ASMA	1.108844	1.084967	1.060515	0.952792
TIMP1	1.156463	0.993464	1.005063	0.926325
TIMP2	1.421769	1.294118	1.282321	1.138057

Values represent relative gene expression levels compared to house keeping gene(target gene/GAPDH).

茵陳清肝湯이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향

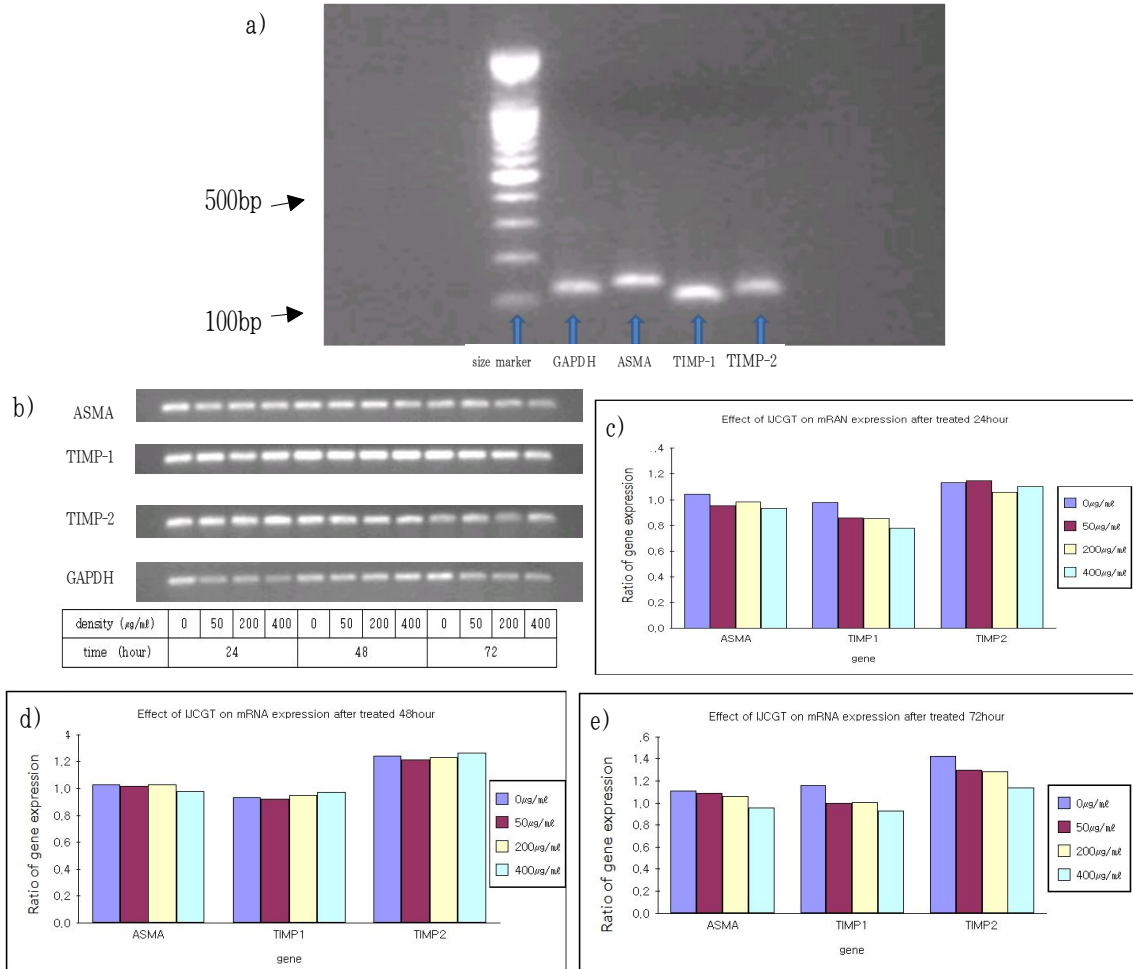


Fig. 3. Effect of IJCGT on ASMA, TIMP-1 and TIMP-2 mRNAs expressions.

Results show that the ASMA and the TIMP-1 gene expressions were inhibited as the concentration increased. TIMP-2 mRNA expressions were inhibited in 72hours. a) PCR bands for size marker and non-treated HSC's GAPDH, ASMA, TIMP-1, TIMP-2 genes. b) PCR bands after treatment of IJCGT. c-e) Relative gene expressions.(c:24hour, d:48hour, e:72hour)

4. 茵陳清肝湯이 procollagen 단백질 발현에 미치는 효과

Procollaen assay를 한 결과 농도의존적으로 procollagen의 량이 감소하였으며 특히 고농도 투여군(200, 400 $\mu\text{g/ml}$)에서 뚜렷하였다(Table 3, Fig. 4).

Table 4. Effect of *Injinchunggan-tang* on Procollagen Production(EIA)

time(hour)	conc.	0 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$
24		44.3	35.1*	22.5**	11.9**
48		50.4	48.0**	45.6***	40.9**
72		39.7	38.6	17.6**	8.8**

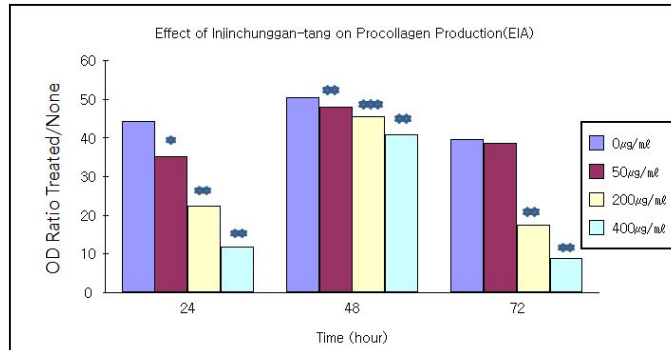


Fig. 4. Effect of IJGGT on procollagen production into the cell medium.

Cells were treated with different dose of each extracts and procollagen volume in the medium was assessed by procollagen Type I C-Peptide EIA kit. Result shows that IJGGT has inhibitory effect on stellate cell's synthesis of collagen. (*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001)

IV. 고찰

한의학에서는 이미 오래 전부터 급, 만성 간질환에서 간경변증, 간암으로의 전변과정을 증후론적으로 잘 관찰하여 왔고¹⁶⁻¹⁷ 간질환에 투여되는 한약물은 간기능 보호와 개선^{10,18}뿐만 아니라 간경변증의 진행에 있어서 주된 역할을 하는 것으로 인정되는 collagen의 합성을 억제하는 효과에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다¹⁹⁻²¹.

茵陳清肝湯은 清熱利濕하는 茵陳四苓散에 涼血止血, 下氣行滯하는 地榆, 靑皮, 蘿菈子를 가미한 처방으로서 실험적 연구에서는 손상된 간 기능의 회복과 동물 간염바이러스를 이용한 전격성간염에서의 생존율을 상승시키는 효과가 있고¹⁰, 약물의 장기 투여에서도 안전성이 있고¹¹, DMN으로 유발된 여러 가지 유형의 간손상 병태에 대한 간 보호 작용 및 간 기능의 회복이 뚜렷하였으며²⁰, TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8 등 inflammatory cytokine 유전자 발현량을 감소시켜 간세포보호효과가 있음이 보고되었다²¹.

간섬유화는 collagen을 포함하여 비정상적인 세포외기질 단백질이 축적되는 것이다. 그 중요기전은 간성상세포의 활성화인데 만성 간질환을 일으키는

심한 손상의 결과로 활성화된 간성상세포가 증식을 동반하면서 다양한 세포외기질 물질을 합성하고 분비하여 축적되는 것이다²⁻⁴. 간성상세포는 활성화 되면 alpha smooth muscle actin(ASMA)을 발현하며, 콜라겐 I형, III형, IV형, fibronectin, laminin, proteoglycan 등 대부분의 세포외기질 구성 단백을 합성하고 분비하는 특징을 보인다²²⁻²⁴. 간섬유화가 회복될 때에는 제I형 콜라겐을 분해하는 Matrix metalloproteinase(MMP)의 출현이 지속되면서 MMP의 발현을 방해하는 TIMP-1의 발현이 급격히 감소함으로 인해 MMP의 활성화는 증가하게 되고, 간성상세포가 사멸하게 되면서 부분적인 회복을 보인다²⁵.

한약물이 간경변증에 미치는 영향에 대한 기존의 연구는 물리적 또는 화학적 방법을 통해 간독성을 야기하거나 혹은 간경변증을 유발시킨 동물 모델을 대상으로 한 것²⁶, 간암세포주를 이용한 것²⁷, 간성상세포를 포함한 비실질세포의 1차배양세포를 통한 procollagen의 합성에 미치는 효과에 관한 것²⁸ 등이 있다. 최근 들어 procollagen 합성의 1차적인 원인으로 인정되고 있는 간성상세포만을 대상으로 인진, 단삼 등 한약재를 처리한 실험들이 보고되고 있다²⁹⁻³⁰. 본 연구에서는 간성상세포를 이

용하여 茵陳清肝湯이 간성상세포의 활성화와 증식, procollagen 합성 및 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

茵陳清肝湯은 저농도 투여군에서는 정상세포의 활성화가 증가하였으며 고농도 투여군에서는 농도의존적으로 세포활성도가 감소하였다(Table 1, Fig. 1).

BrdU Assay를 시행한 결과에서는 농도의존적인 증식억제 효과가 있었으며, 특히 고농도 투여군에서 뚜렷하였다(Table 2, Fig. 2).

RT-PCR 결과에서는 농도에 의존적인 ASMA, TIMP-1 유전자의 발현감소가 관찰되었으며 TIMP-2 유전자의 발현은 고농도(400 μ g/ml)에서 72시간 후 감소되는 것이 관찰되었다(Table 3, Fig. 3).

간섬유화의 진행과정에서 축적되는 ECM중 가장 중요한 procollagen 축적과 관련하여 Procollagen Type I C-peptide EIA Kit(TaKaRa, Japan)를 사용한 assay를 한 결과에서는 농도의존적으로 procollagen 양이 감소하였으며, 특히 고농도에서 뚜렷하여 茵陳清肝湯이 간성상세포의 procollagen 합성을 억제함을 알 수 있었다(Table 4, Fig. 4).

이상의 결과들을 종합하여 고려할 때, 茵陳清肝湯의 투여로 간성상세포의 활성화, 증식, procollagen의 합성을 억제할 수 있음이 확인되었는데 이는 ASMA 유전자의 발현을 억제하여 정상세포의 활성을 줄여주고, TIMP-1과 TIMP-2 유전자의 발현을 줄여주어 TIMP-1,2 단백질의 억제를 받는 Matrix Metalloproteinases를 활성화시켜 procollagen의 용해를 촉진시킴으로 간섬유화의 진행을 억제할 것으로 판단되었다. 이러한 관찰에 근거한 구체적인 치료기전의 규명 및 약물의 투여시간과 유효농도에 대하여는 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

V. 결론

茵陳清肝湯이 간성상세포의 세포활성과 증식능력, procollagen 합성 및 그 유전자 발현에 미치는

영향을 관찰하고자 rat의 간성상세포에 약물을 처리한 후 MTT Assay, BrdU assay, RT-PCR 및 Procollagen Assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 茵陳清肝湯은 고농도 투여군에서는 간성상세포 활성을 억제하였다.
2. 茵陳清肝湯은 간성상세포의 증식을 고농도 투여군에서 억제하였다.
3. 茵陳清肝湯은 ASMA 유전자의 발현을 농도의존적으로 억제시켰으며, TIMP-1 유전자의 발현은 24시간, 72시간 투여군에서는 억제하였고 TIMP-2 유전자의 발현은 72시간 투여군에서 농도의존적으로 억제하였다.
4. 茵陳清肝湯은 농도의존적으로 procollagen의 합성을 억제하였다.

이상에서 茵陳清肝湯은 간성상세포의 활성화와 증식, Procollagen 합성을 억제하여 간섬유화 억제 효과가 있는 것으로 판단되었으며 향후 정확한 작용기전 및 약제의 농도에 대하여는 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 2007사망원인통계결과. 통계청; 2008. 9.
2. Baroni GS, Pambrosio L, Ferretti G et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1998;27:720-6.
3. 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.
4. Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Masaki T, Fukui H. Imatinib mesylate

- (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. American journal of physiology. 2005 :288(5):907-13.
5. 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 :386-94.
 6. 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.
 7. Jezequel AM, Ballardini G, Mancini R, Paolucci F, Bianci FB, Orlandi F. Modulation of extracellular matrix components during dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. J. Hepatology. 1990;11:206-14.
 8. Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. J. Hepatology. 1985;1:489-99.
 9. Scott L, Friedman. Liver fibrosis—from bench to bedside. Journal of Hepatology. 2003;38:38-53.
 10. 우홍정, 만성 B형 간염에 대한茵陳清肝湯의 효과, 제2회 한중학술대회(간장병)논문집. 1995 :18-53.
 11. 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳清肝湯의 안전성에 관한 研究. 경희한의대논문집. 1997;20(2) :133-50.
 12. 심재욱, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕이 TGF- β 1 媒介性 肝纖維化에 미치는 影響. 대한한학회지. 2003;24(2).
 13. 김지권, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳清肝湯이 kupffer cell의 inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1).
 14. 승현석, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳清肝湯이 肝保護 및 纖維化 抑制에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2003;24(1).
 15. 대한약전의 한약규격집. 서울: 식약청; 1985.
 16. 장중경. 금계요략. 서울: 행림서원; 1984. p. 32-4.
 17. 전국 간계내과학 교수 일동. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001. p. 323-50.
 18. 이장훈. 三七生肝湯의 效能에 關한 實驗的 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1994:17(2).
 19. 이지현, 이장훈, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 TGF- β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):93-106.
 20. 박상백, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳淸肝湯이 DMN 유발 간섬유화 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):200-18.
 21. 김지권, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳淸肝湯이 kupper cell의 inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):46-58.
 22. Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYPEI mediated oxidative stress induced collagen type1 expression in rat hepatic stellate cells. Hepatology. 1999;30:987-96.
 23. Olasso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. J. Hepatology. 1998;29 :836-47.
 24. Gres sner AM. Cytokines and cellular cross talk involved in the activation of fat storing cells. J. Hepatol. 1995;22:28-36.
 25. Issa R et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution with matrix cross-linking. Gastroenterology. 2004;126(7):1795-808.
 26. 강병기, 홍석의, 六鬱湯 및 散鬱湯이 DMN및 담도결찰로 유발된 간경변증에 미치는 영향. 제2회 한중학술대회(간장병)논문집. 1995:91-122.
 27. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳이 TGF- β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한학회지. 2001;22(3):141-55.

28. 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 흰쥐의 간조직에서 비실질세포의 procollagen 합성억제에 미치는 효과에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2003;24(4):817-25.
29. 김성아, 우홍정, 김영철, 이장훈. 茵陳이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):177-88.
30. 최은경, 이장훈, 김영철, 우홍정. 丹蔘이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(2):299-310.