

## Carbon tetrachloride로 유도된 Rat의 간섬유화세포에 있어서 한방관련 기능성 성분의 항염증 효과

건국대학교 의료생명대학 생명과학부  
정용준, 홍두표, 최세영, 지문숙, 임병우\*

### Anti-inflammatory effect of chinese herb related functional components in liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in sprague-dawley rat

Department of Applied Biochemistry, College of Biomedical and Health Science, Konkuk  
University, Chung-Ju, Chungbuk, Korea 380-701

Yong Jun Jeung, Doo Pyo Hong, Se Young Choi, Moon Suk Ji, Beong Ou Lim\*

#### 연구목적

발아현미상황이 IgE 생산 억제와 IgA 생산 촉진의 면역조절 활성 및 항암활성에 대해 발표한바 있으며, 쑥은 종양경화인자로서 활성을 나타내 직접적 세포독성으로 인하여 항종양 효과가 보고된바 있다. 본 연구에서는 증류수를 추출 용매로 한 강화 약쑥과 발아현미상황을 사용하여 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)로 유도된 Sprague-Dawley Rat의 간 섬유세포에 대한 항염증 효과를 검토하였다.

#### 재료 및 방법

리터당 현미 약 50g을 키토산 0.01% 추출물이 포함된 녹차에서 미생물생육을 억제 후 18~25℃를 유지하여 3일 동안 발아 시켰다. 여기서 얻어진 발아현미를 500ml 플라스크에 넣어 상황버섯 균사체를 접종 후 20~25℃로 12일간 재배하여 중간 물질을 얻은 후 9시간 동안 열수추출을 통하여 발아현미상황 추출물을 동결건조 하여 시료를 획득하였다. 강화 약쑥은 잘게 다진 후 9시간 동안 열수추출을 통하여 추출물을 동결건조 하여 시료를 획득하였다. 동물실험은 온도, 습도가 일정하게 유지되는 청정 동물실에서 시행하였으며 사료 및 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물 실험군은 대조군, EPB 투여군, CCl<sub>4</sub> 투여군, CCl<sub>4</sub>+EPB 투여군, 강화약쑥 투여군, CCl<sub>4</sub>+강화약쑥 투여군으로 구분하여 6그룹을 실험하였다.

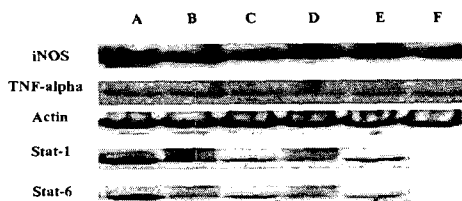
간의 섬유화의 유발을 위해 CCl<sub>4</sub>를 체중 당 1ml/kg로 50% (v/v)로 corn oil에 희석하여 주 3회 피하주사를 실시하였다. 시료의 투여는 체중당 200mg/kg으로 주 5회를 투여하였으며 총 5주에 걸쳐 실험을 진행하였고 6째 주에 희생을 통하여 혈액 채취 후 간에서 조직절편을 얻었다.

간세포와 간성상 세포의 분리는1994년 Alpini의 방법을 응용하였다. Rat를 에테르로 마취시킨 다음 개복하여 간문맥을 노출시켰다. 간문맥을 통해 Ca<sup>++</sup>가 없는 HBSS를 37℃를

유지 하면서 10ml/1min의 속도로 10분간 관류 시킨 후 0.04%의 collagenase 가 들어있는 Ca<sup>++</sup> 함유 HBSS를 15분간 관류 시켜 간의 세포외기질을 소화시켰다. 간을 샐알레에 담아 잘게 잘라 5ml을 600rpm으로 5분간 원심 분리하여 간세포를 얻고 나머지는 0.02%의 collagenase, 0.05%의 pronase, 0.001%의 DNase가 들어있는 DMEM에 넣어 25분간 37°C를 유지하면서 흔들어 주었다. 그 후 현탁액을 106 $\mu$ m 크기의 nylon gauze에 걸러 600rpm에서 2분간 원심 분리하여 남은 간세포를 제거하고 나머지는 2000rpm에서 10분간 원심 분리하여 간세포이외의 세포를 얻었다. 이를 다시 DMEM을 넣어 불순물을 제거하고 28% nycodenz 용액과 섞어 최종농도가 11.5% nycodenz가 되게 만들었다. 이를 17.2% nycodenz 용액 위에 조심스럽게 얹고 그 위에 HBSS를 2ml 넣은 후 2000rpm에서 15분간 원심 분리 하였다. 위에 얹은 HBSS와 11.5% nycodenz 사이에 뿌연 세포층이 관찰되었고 여기서 간성상세포를 얻었다.

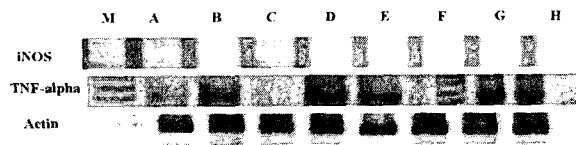
### 결과 및 고찰

본 실험에서는 증류수를 추출 용매로 한 강화 약쭉과 발아현미상황을 사용하여 항염증에 효과가 있는지 실험하였고 시료의 농도는 단일 농도 (200mg/kg)로 처리한 Rat의 간세포를 사용하였다. TNF-alpha iNOS는 western blot, RT-PCR로 Protein과 mRNA의 발현을 분석하였다. iNOS는 발아현미 상황군과 사염화 탄소와 발아현미 상황을 투여한 군에서 protein, mRNA의 발현량이 증가하였다. TNF-alpha 역시 mRNA의 경우 발아현미 상황군 및 CCl<sub>4</sub>와 발아현미 상황을 동시에 투여한 군에서 발현량의 증가를 보였다. 반면 protein 의 발현은 CCl<sub>4</sub>>CCl<sub>4</sub>+발아현미상황>발아현미상황의 순으로 보여주었다. 따라서 발아현미상황의 경우, 강한 염증반응을 유발시키는 경향을 보이거나, 동시에 TNF-alpha의 발현을 억제 시킴으로서 apoptosis의 유도 억제 및 항 섬유화에 대한 효과가 있음을 예상할 수 있다. 강화약쭉의 경우 TNF-alpha, iNOS의 발현에 있어서 CCl<sub>4</sub> 투여군에 비해서 낮은 발현율을 보여 치료제로서의 가능성을 제시하여 주고 있다.



A: Control, B: CCl<sub>4</sub>, C: 강화약쭉, D: 강화약쭉 + CCl<sub>4</sub>,  
E: 발아현미상황, F: 발아현미상황 + CCl<sub>4</sub>

Western blot analysis of the effect of *Phellinus inteus* grown on germinated brown rice and *Artemisia capillariss* pretreatment on iNOS, TNF, STAT-6,1 levels in CCl<sub>4</sub> induced HSC



A: Control  
B: 발아현미상황  
C: CCl<sub>4</sub>  
D: 발아현미상황 + CCl<sub>4</sub>  
E: 강화사자발쭉  
F: 강화사자발쭉 + CCl<sub>4</sub>  
G: 인진쭉  
H: 인진쭉 + CCl<sub>4</sub>

RT-PCR analysis of the effect of *Phellinus inteus* grown on germinated brown rice and *Artemisia capillariss* pretreatment on iNOS, TNF levels in CCl<sub>4</sub> induced HSC