

인진슬기의 간섬유화 억제 효과

장선일, 김형진, 황기명, 권태오¹, 제갈승주², 김윤철¹,
배현옥¹, 최병민¹, 심재석³, 곽준수⁴, 정헌택¹, 윤용갑¹

원광대학교 의과대학 미생물 및 면역학교실, ¹원광대학교 의약자원연구센터,
²원광보건대학 임상병리학과, ³임실생약조합법인, ⁴마산대학교

Abstract

Inhibitory effects of Injinseulki on Chemical-induced hepatic fibrosis in Rats

S.I. Jang, H.J. Kim, K.M. Hwang, T.O. Kwon¹, S.J. Jekal², Y.C. Kim¹,
H.O. Pae¹, B.M. Choi¹, J.S. Shim³, J.S. Kwak⁴, H.T. Chung¹, Y.G. Yun¹

Department of Microbiology and Immunology, Wonkwang University, School of Medicine,

¹Medicinal Resources Research Center of Wonkwang University,

²Department of Clinical Pathology, Wonkwang Health Science College,

³ImSil phytomedicinal Incorporation, ImSil, Chonbuk, 566-893, Republic of Korea.

⁴MaSan College, MaSan, KyongNam 630-720 Republic of Korea.

The inhibitory effects of Injinseulki including extracts of melanian snail plus phytomedicinal plants on CCl₄-induced fibrosis, IFN- γ plus LPS-induced production of NO, PMA-stimulated production O₂⁻, and tacrine-induced hepatic injury were investigated in rats, RAW 264.7 or HepG2 cells. The ethanol extracts of melanian snail significantly inhibited tarcrine-induced injury of HepG2 cells. Injinseulki inhibited the production of NO and O₂⁻ in a dose-dependent manner in activated RAW 264.7

macrophages. Injinseulki significantly inhibited chemical-induced fibrosis in Rats.

These results show that Injinseulki including extracts of melanian snail plus phytomedicinal plants may explain some known biological activities of Injinseulki including their anti-inflammatory and anti-fibrotic effect, and is of considerable benefit in the treatment for live diseases.

Key word : Injinseulki, fibrosis, nitric oxide (NO), supeoxide anion (O_2^-).

I. 서 론

간섬유화(hepatic fibrosis)는 간경화(cirrhosis)의 전 단계로서 extracellular matrix protein(EMP), 특히 콜라겐의 과도한 축적으로 발생된다^{1),2)}. 간이 손상되면, 지방과 ratinoid 저장 세포라 불리는 활성화된 stellate cell에서 세포외부 매개 단백질이 합성된다. 이 세포의 활성화는 glutathione(GSH)의 고갈에 의한 해독작용의 실패 또는 cytochrome C P450(CYP450)의 발현 및 Kupffer cell과 염증반응으로부터 유입된 면역세포에 의해 nitric oxide(NO), superoxide anion(O_2^-), peroxynitrate 와 같은 자유 유리기(free radical)에 의해 간세포의 손상을 초래함은 물론, 여러 가지 cytokine 및 chemokine의 작용에 의해서 일어난다³⁾⁻⁵⁾.

손상된 간조직에서 stellate cell은 상처를 봉입하기 위해서 활성화되고 계속적으로 증식하면서 myofibroblast-like cell로 변형된다. 이러한 과정에서 cellular ratinoid가 소실되면서 α -smooth muscle actin (α -SMA)이 합성되고 콜라겐(타입 I, II, III), fibronectin, laminin, 및 proteoglycan과 같은 EMP를 과량 생산한다^{1), 4)-8)}. 이와 같이 EMP가 과량 생산되면서 간섬유화가 계속적으로 진행되고, nodule이 형성되면

서 간경화에 이른다¹⁾.

Kupffer cell이 활성화되면 염증반응이 일어나는데, 이때 Kupffer cell은 O_2^- , hydroxide (OH), 과산화물 (H_2O_2)등과 같은 반응산소 중간물질(reactive oxygen species, ROS)을 생산하고 증가된 ROI에 의해 간세포(hepatocyte)에 손상을 주어 결국 세포사멸에 이르게 한다⁹⁾⁻¹¹⁾. 특히 O_2^- 은 NO와 반응하면서 더욱더 독성이 강한 peroxynitrate가 형성되면서 간세포를 사멸케한다¹⁰⁾. 또한 활성화된 Kupffer cell은 transforming growth factor- β (TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine을 생산하고 이로 인해서 간세포의 사멸뿐만 아니라 stellate cell의 활성을 유도하는 것으로 알려졌다¹¹⁾⁻¹⁵⁾.

한편 lipid peroxydation은 콜라겐 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려졌고, 최근에 stellate cell은 lipid peroxidation의 산물인 malondialdehyde (MDA)에 의해 유도된 자유유리기에 의해 활성화된다는 보고가 있다. 그런데 type I collagen의 발현과 ROS는 항산화제에 의해 억제 될 수 있다^{16),17)}.

최근 식물 유래 항산화제의 관심이 높아지면서 이와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 일본에서는 Sho-saiko-to (TJ-9)을 대상으로 간섬유화 억제 기전에

대한 연구가 밝혀지면서 중국을 비롯한 여러 나라에서 식물성 유래 항산화제와 관련된 간질환 연구가 활발히 수행되고 있다¹⁹⁻²¹⁾. 즉, 전통적으로 동양에서 사용되고 있는 식물성 약제의 연구가 현대 생물학적인 방법에 의해 그 약효를 증명하고 기전을 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구는 다슬기를 함유한 식물성 유래 생약 (인진쑈, 지구자, 마늘, 백작약, 당귀, 황정, 감초, 대추, 계피, 건강 및 치자)으로 조성된 인진슬기(임실영동생약조합법인)가 사염화탄소로 유발된 백서의 간섬유화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 인진슬기가 처리된 백서의 간조직은 콜라겐과 간세포 변형을 크게 억제하는 효과가 있었다. 또한 설치류 대식세포주인 RAW 264.7을 대상으로 인진슬기를 처리한 결과 ROS와 NO 생산이 억제되는 효과가 있었으며, tacrine으로 유발된 HepG2 세포손상을 보호해주는 효과가 있었다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

루이스 랫트 (체중 180 ±25 g)는 임무노피아사 (원광대학교 원광창업보육센터, 전북 익산)로부터 구입하여 항온 및 항습이 유지되고 낮과 밤을 12시간씩 조절되는 원광대학교 의과대학 미생물학교실 사육장에서 사육하면서 약물의 효과실험에 사용하였다. 또한 이들 약물의 독성평가를 하기 위하여 BALB/c 계열 마우스를 임무노피아에서 구입하였다.

2. 시 약

Lipopolysaccharide(LPS), Tacrine, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), Ferricytochrome C, Phorbol myristate acetate(PMA), Alanine aminotransferase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST), Formalin, Fast green, Sodium chloride, Potassium chloride, Disodium hydrogen phosphate, Potassium dihydrogen phosphate, Hematoxylin 과 Eosin, Anti- α -smooth muscle actin antibody, Interferon- γ 등은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Anti-murine TNF- α 는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)사로부터 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), DMEM 및 항생제는 Gibco/BRL사 (Gaithersburg, MD)로부터 구입하였다. 세포배양용기는 Nunc사(NAperville, IL)로부터 구입하였다.

3. 다슬기 및 생약추출물의 제조

전북 임실군 임실생약조합으로부터 다슬기 또는 다슬기와 인진쑈, 지구자, 마늘, 백작약, 당귀, 황정, 감초, 대추, 계피, 건강 및 치자 등 11가지 생약 (총량 3,000 g)을 혼합하였고, 혼합비율은 다슬기가 70%, 상기 생약이 총 30%로 조성되게 하였다. 다슬기, 인진쑈 또는 인진슬기의 추출은 전통적인 방법을 이용하여 증류수로 3시간 동안 가온 및 가압하여 추출하였다. 추출물은 0.45 μ m 여과막으로 여과한 후 동결건조하였다. 얻어진 추출 분말은 -20°C에 보관하면서 사용하였다.

4. RAW 264.7 세포주의 배양

인진슬기가 O_2^- 및 NO의 생성능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 설치류의 대식세포 RAW 264.7을 사용하였다. 설치류의 대식세포 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC TIB TIB-71, Rockville, MD)에서 구입하여, DMEM 배지로 1×10^6 세포/ml의 농도를 유지했고, 여기에 10%의 열에 비활성화된 우태아 혈청, 페니실린 G (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 μ g/ml) 및 L-글루타민 (2 mM)을 보충하여, 5% CO_2 와 95%의 공기를 포함하는 가습 조건 하에서 37°C 온도를 유지하여 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 인진슬기를 여러 가지 농도 (1 ~ 500 μ g/ml)로 2시간 전 처리하고 10 ng/ml의 LPS와 10 U/ml의 IFN- γ 로 자극하여 NO의 생성능력을 측정하였다.

5. HepG2 세포주의 배양

간암세포주인 HepG2 세포주는 American Tissue Culture Collection (ATCC TIB TIB-71, Rockville, MD)로부터 얻었다. 56°C로 불활성화시킨 10% FBS, 1% L-글루타민, 1% 항생제/항균제 (10,000 U/ml의 페니실린, 25 μ g/ml의 암포테신 D 또는 10 mg/ml의 스트렙토마이신)이 첨가된 DMEM 배지에서, 37°C의 온도로 가습된 5% CO_2 상태를 유지하면서 24시간 동안 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 여러 가지 농도(1 ~ 500 μ g)로 2시간 전 처리하고 MTT assay법에 의해 생존율을 조사하였다.

6. 약물 투여

다슬기, 다슬기+인진쑈 또는 인진슬기

추출물을 루이스 랫트 체중 kg 당 1 ml의 생리식염수에 100 mg되게 농도를 적정하고 마리당 1 ml 씩 경구투여하였다. 대조군은 생리식염수만 투여하였다. 이때 각 실험군 당 20마리를 사용하였고, 6일간 상기의 약물을 투여한 후 사산화염소와 콘오일 (1:3)을 혼합하여 마리 당 1 ml씩 4주간 주일 당 2회 복강에 주사하였고 약물은 4주간 매일 1회 경구투여하였다.

7. ALT 및 AST assay

인진슬기의 독성평가를 위해서 BALB/c 계 마우스를 이용하여 실험군당 20마리를 대상으로 인간 (60 kg, 체중)의 투여량 (15 g, 추출물)의 50배를 용해한 후 희석하여 0배, 1배, 10배, 50배 약물군으로 나누어 경구투여하고 1회 급성독성과 10 배의 약물을 1일당 1회씩 30일간 투여하여 만성독성을 평가하였다. 독성평가는 사망률과 혈청내로 유리되는 ALT 또는 AST의 양을 시그마 진단키트를 이용하여 통상적으로 권장하고 있는 시그마사의 방법에 준하여 그 흡광도를 측정하였다.

8. Ferricytochrome C assay

RAW 264.7 대식세포 (1×10^6 /ml)를 96 well plate에 주입하고 12시간동안 충분히 부착시킨 후 2시간 동안 인진슬기를 처리하고 phenol red free HBSS로 3번 세척한 후 2 mg/ml의 ferricytochrome C와 1 μ g/ml의 PMA를 phenol red HBSS에 용해하여 RAW 264.7 세포에 주입하고 30분간 37°C에 배양하였다. 그 후 550 nm로 흡광도를 측정하여 Pick²⁸⁾의 방법에 따라 O_2^- 의 양을 nmol로 계산하였다.

9. 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-아지닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griss reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μ l의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μ l씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토메타 (MD, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준 커브로부터 계산하였다.

10. HE 염색

4주간 약물 투여가 종료된 루이스 랫트에 5% Nembutal (Abbot, US)을 복강에 주사하고 마취시킨 후 복강을 주의 깊게 절개하고, portal vein에 23 게이지의 시린지를 삽입한 후 칼슘이 들어있지 않고 1,000 U의 헤파린 (Sigma)이 함유된 인산완충용액을 36%로 가온하여 간 조직에 유입된 혈액을 제거했다. 즉, 120 cm의 높이에서 간 조직에 유입되는 인산완충액을 분당 15 ml이 흐르게 하여 20 분간 퍼퓨전을 했다. 혈액이 제거된 간 조직은 주의 깊게 약 5 mm 정도 잘라내어 중성화된 10% 포르말린 (pH 7.4)에 24시간 이상 냉장상태로 고정하여 통상적인 방법으로 파라핀 메몰 조직을 제작하고 약 5 ~ 6 μ m

두께로 조직을 자른 후 일련의 자일렌을 이용하여 파라핀을 제거하고, hematoxylin & eosin (HE) 염색을 하여 올림프스 (Japan) 현미경으로 검경하면서 촬영하여 간 조직의 세포변형을 확인하였다.

11. Sirius red 염색

콜라겐 염색은 Yutaka 등²²⁾의 방법에 따라 파라핀이 제거된 간 조직을 포화 picric acid와 1% Fast green이 함유된 0.1% Sirius red F3B 용액에 30분간 방치한 후 증류수로 2회 세척하고 70% 에탄올로 간단히 탈수시킨 다음 자일렌으로 세척하고 커버슬립을 덮어 봉입하여 현미경으로 검경하고 촬영하여 콜라겐 합성정도를 판정하였다. 실리우스 레드 염색상태에 따른 간 섬유화의 스코어는 Ishak 등²⁹⁾의 방법에 따라 스코어 0은 간 섬유화 없는 정상 세포, 스코어 1은 섬유 셉타 (fibrous septa)가 약간 있거나 없이 일부 문맥주위에 약간의 섬유소 팽창, 스코어 2는 섬유 셉타 (fibrous septa)가 약간 있거나 없이 대부분 문맥주위에 섬유소 팽창, 스코어 3은 문맥과 문맥사이에 섬유가교 (portal to portal(P-P) bridging)가 형성되고 전 문맥으로 섬유소 팽창, 스코어 4는 문맥과 문맥 (P-P)사이 뿐만 아니라 문맥에서 중심 (portal to central(P-C))까지 뚜렷한 섬유가교가 형성되어 전 문맥주변으로 섬유소 팽창, 스코어 5는 nodule 형성 (간경화 초기 증상)과 함께 뚜렷한 P-P/P-C 섬유가교가 형성, 스코어 6은 심한 nodule 형성으로 간경화 상태 등 6가지로 나누어 평가하였다.

12. 통 계

모든 실험은 3회 이상 실시하였고, 분석 결과는 ANOVA로 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

NO는 아지닌으로부터 일산화질소 합성 효소 (nitric oxide synthase, NOS)에 의해 시투롤린으로 전환되면서 생성되어 생체 조절자의 역할을 하는데, 대식세포에 의해서 분비되는 NO는 항균, 항종양 및 항암 효과를 나타내고, 내피세포나 근육세포를 비롯한 생체 내 다른 세포에서 생성하는 소량의 NO는 혈관 확장 및 신경전달 물질로 그 역할을 수행하는 것으로 잘 알려졌다^{23),24)}. 특히 NO는 간세포의 손상으로부터 보호하는 역할이 최근에 알려지면서 생체에서 방어는 물론 조직 및 세포 손상을

억제하는 것으로 알려졌다²⁵⁾.

본 연구에서는 손상된 간세포에 다슬기의 추출물이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 1 tacrine으로 HepG2 세포의 손상을 유발하고 용매에 따른 다슬기 추출물을 처리하여 세포보호 효과를 MTT 시험을 하여 확인하였다. tacrine 단독으로 처리한 실험군의 세포생존율을 0%로 하고, 각 용매의 농도에 따른 흡광도를 tacrine 단독처리군의 흡광도로 나누어 백분율로 표시하였다. 에탄올, 부탄올 또는 물에 의한 다슬기 추출물과 타크린을 동시에 처리하고 배양세포의 세포생존능력을 측정된 결과 부탄올과 물추출물에서 사용된 농도와 관계없이 약 10 ~ 30%의 세포생존율을 보였다. 그러나 에탄올 추출물의 경우 세포생존율이 농도 의존적으로 크게 증가되었다. Table 1과 같이 에탄올 추출물 처리의 경우 0.1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 약 30 ~ 36%로 부탄올이나 물에 의

Table 1. Hepatoprotective effects of the ethanol soluble extracts of melanian snail on tacrine-induced cell injury in HepG2 cells

Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Solvents		
	Ethanol	Butanol	Water
0	0	0	0
0.1	36.72 \pm 4.40	26.33 \pm 1.44	14.56 \pm 6.05
1	31.67 \pm 2.82	28.98 \pm 1.63	12.73 \pm 3.91
10	32.64 \pm 2.13	27.89 \pm 4.73	12.08 \pm 3.49
50	58.92 \pm 2.90	24.49 \pm 6.12	14.02 \pm 3.55
100	62.10 \pm 1.87	29.39 \pm 1.87	23.62 \pm 1.29
200	67.50 \pm 1.92	27.62 \pm 3.40	19.31 \pm 5.04

HepG2 cells ($1 \times 10^5/\text{ml}$) were incubated with tacrine for 2h in presence ethanol, butanol or water soluble extract of melanian snail. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means \pm SD of three independants.

한 추출물에서 나타난 생존율보다 높게 나타났다. 특히 에탄올 추출물 50 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 세포생존율이 60% 이상으로 매우 유의성 있게 증가되었다.

이러한 에탄올 추출물의 뛰어난 세포보호 효과를 양성 대조군 즉, 실리마린을 처리하여 비교한 결과 실리마린은 ED50이 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, 에탄올 다슬기 추출물은 30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 이와 같이 다슬기 에탄올 추출물은 간세포 보호에 유용하게 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 다슬기

는 아지닌, 라이신을 비롯한 16종의 아미노산으로 구성되어 있다는 보고가 있는데, 그 중에서도 아지닌 산이 총 아미노산 5267 mg 중 409.3mg으로 7.74% 차지하고 있어서 다른 어패류에 비해서 알기닌 산이 풍부하다고 알려졌다. 알기닌은 체내에서 NO 형성에 필수적인 요소로 알려졌다. 그러나 NO와 관련된 다슬기의 간세포 보호 효과는 앞으로 연구해야할 과제로 남아 있다.

간 조직에서 Kupffer cell이 활성화되면

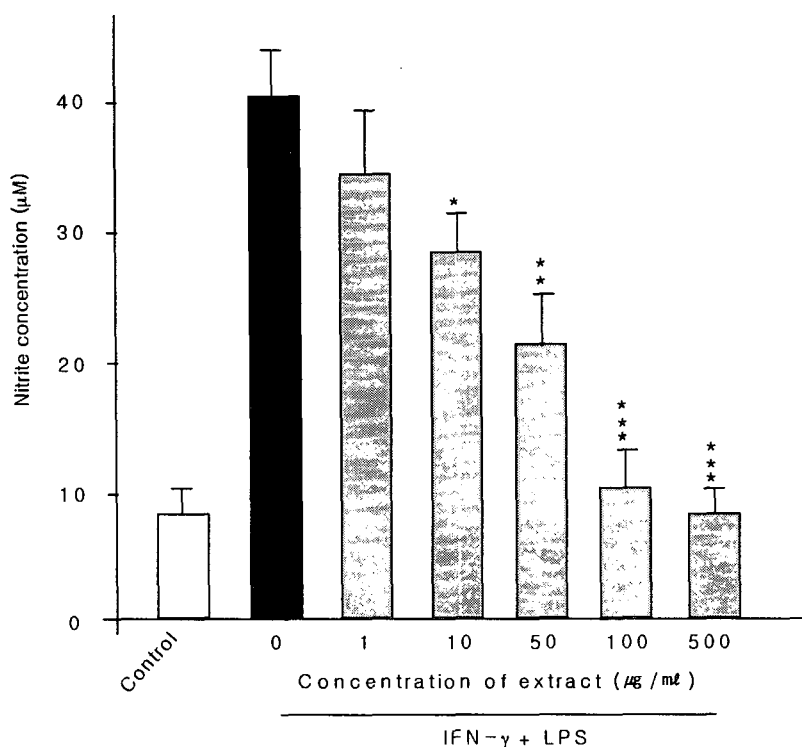


Fig. 1. Inhibitory effects of Injinseulki on NO production by IFN- γ plus LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated with or without IFN- γ plus LPS for 24 h in the presence or absence of Injinseulki at indicated doses. NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are means \pm SD of three independent experiments. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ compared with the control (medium alone).

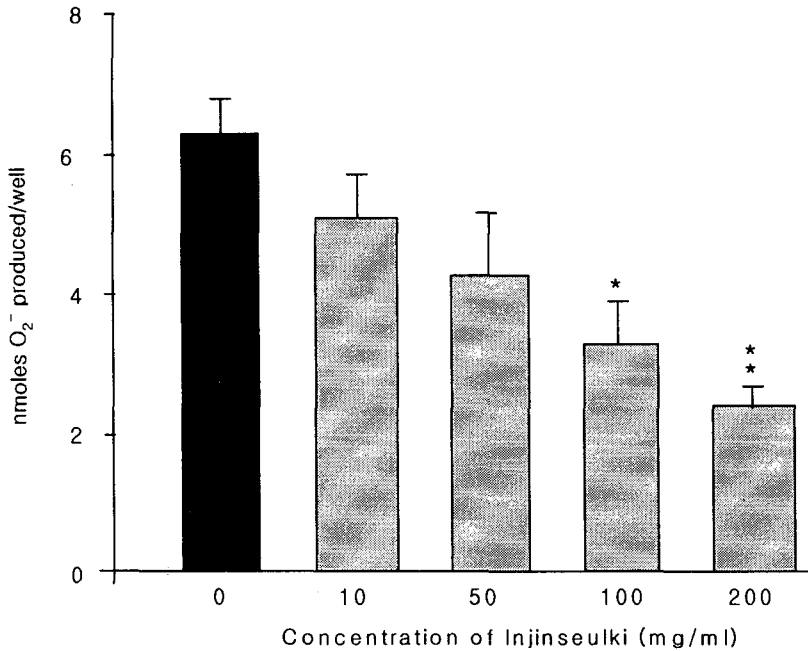


Fig. 2. Inhibitory effects of Injinseulki on O₂⁻ production by PMA-stimulated RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells (1×10^6 /ml) were preincubated with or without Injinseulki (10-200 μ g/ml). O₂⁻ was assessed following stimulation of RAW 264.7 with PMA (1 μ g/ml) for 30 min. Data are means \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control (0 Injinseulki).

과량의 NO가 생성되는데, NO는 O₂⁻와 결합하면 peroxynitrate로 변하면서 더욱더 큰 독성을 발휘하게 된다. 이로 인해 간세포가 파괴되어 사멸에 이르게 한다⁹⁾⁻¹¹⁾. 더욱이 Kupffer cell이 활성화되면 pro-inflammatory cytokine이 과량 분비됨으로써 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려졌다¹¹⁾⁻¹⁵⁾. 따라서 과량의 NO와 O₂⁻ 생성을 억제한다면, 간 조직 및 세포의 손상을 방지할 수 있을 것이다. 그러므로 본 연구에서는 다슬기를 주성분으로 한 생약혼합물로 조성된 인진슬기가 NO의 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 간 조직에서

Kupffer cell과 비슷한 설치류 대식세포 RAW 264.7 세포를 이용하여 1, 10, 50, 100 및 500 μ g/ml의 인진슬기를 처리 또는 처리하지 않은 조건하에서 IFN- γ 와 LPS로 자극하여 24시간 배양하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 처리 농도가 증가할수록 NO 생성량이 유의하게 억제되었다.

특히 100 μ g/ml의 경우 대조군 (어떠한 약물도 처리되지 않은 세포)과 비슷하게 억제되는 현상을 보였다($p < 0.001$). 또한 인진슬기가 RAW 264.7 대식세포의 O₂⁻ 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2시간 동안 인진슬기를 전처리하고 PMA로

자극함과 동시에 ferricytochrome C를 주입하고 30분간 37°C에 배양하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 인진슬기의 농도에 따라 O₂의 생성이 억제되었고, 100 µg/ml 농도에서는 유의성(p<0.05)있게 억제되었으며, 200 µg/ml 농도에서는 현저하게 억제되었다(p<0.001). 따라서 인진슬기는 NO와 O₂와 같은 세포 손상 자유유리기를 효과적으로 억제할 수 있는 약제라 사료된다.

한편 다슬기, 인진썩, 다슬기+인진썩 또는 인진슬기가 간조직 및 세포에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해서 간세포 변형 및 간 섬유화에 따른 약물 효과에 빈번하게 사용되는 방법중의 하나인 사염화탄소를 처리하여 각 약물의 섬유화 억제 실험을 하였다. 즉, 6일간 음성대조군과 양성대조군은 생리식염수를 투여하고, 각 약물을 랫트 한 마리 당 1 ml (체중 1 kg 당 300 mg)씩 생리식염수를 이용하여 적정하여 경구투여하였다. 약물이 투여된 6일 후에 사염화탄소로 1주에 2회씩 4주간 복강에 주사하였고, 그 동안 하루에 1회씩 각 추출물을 4주간 경구투여 하였다. Fig. 3과 같이 대조군 및 약물 투여군의 간 조직을 HE 염색을 하여 100배 현미경 소견을 조사한 결과 음성대조군 (Fig. 3A)은 간 조직세포의 정상소견을 보였으나, 사염화탄소가 투여된 양성대조군 (Fig. 3B)은 전체적으로 큰 지방세포 (fat vacuoles)의 출현과 함께 문맥부위 (portal area)로 섬유성 확장 (fibrous expansion)이 관찰되었으며, 일부에서는 문맥부위와 문맥부위를 연결하는 섬유성 격벽 (fibrous septae)이 뚜렷하게 나타나 간 섬유화가 유도된 전형적인 현상을 관찰하였다.

그러나 다슬기 또는 인진썩 추출액이 투

여된 지방공포가 남아있기는 하나 뚜렷하게 감소하였으며, 문맥부위 주변에 약간의 섬유성 조직이 관찰되나 섬유성 격벽은 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 3C와 D). 다슬기와 인진썩의 혼합추출물액이 투여된 랫트의 간 조직은 좌단에 소수의 지방공포가 남아있으나 문맥부위 이외의 부위에서 섬유성 조직은 관찰되지 않았다 (Fig. 3E). 한편 인진슬기 투여군의 경우 간조직은 극소수의 지방공포가 관찰되나 섬유성조직도 없으며 거의 대부분 정상조직으로 이루어져 있었다(Fig. 3F).

또한 다슬기, 인진썩, 다슬기+인진썩 또는 인진슬기가 간 섬유화 억제에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기와 같이 약물이 투여된 랫트의 간 조직을 실리루스 레드 (Sirius red) F3B 용액을 이용하여 콜라겐을 염색하여 현미경으로 검경하고 촬영하여 콜라겐 합성정도를 판정하였다. 간 섬유화 진행판단은 Ishak 등²⁹⁾의 방법에 따라 0-6까지 스코어를 주어 판단하였다. Fig. 4는 실리루스 레드 (Sirius red) F3B 용액을 이용하여 콜라겐을 염색한 후 각 실험군에서 40배의 현미경으로 관찰된 모습을 보여준 것이다. 생리식염수만 투여된 음성대조군에서는 Fig. 4A에서 나타낸 바와 같이 섬유소가 없고 정상세포로 이루어진 간 조직의 소견을 보여주었으며, 생리식염수에 사염화탄소가 투여된 양성대조군은 Fig. 4B와 같이 스코어 4로 문맥과 문맥 (Portal to portal, P-P)사이 뿐만 아니라 문맥에서 중심 (portal to central, P-C)까지 뚜렷한 섬유가교가 형성되어 전 문맥 주변으로 섬유소가 팽창된 소견을 보여주었다. 반면, 다슬기 추출액 투여군은 양성대조군 (스코어 4)에 비해 문맥과 문맥사

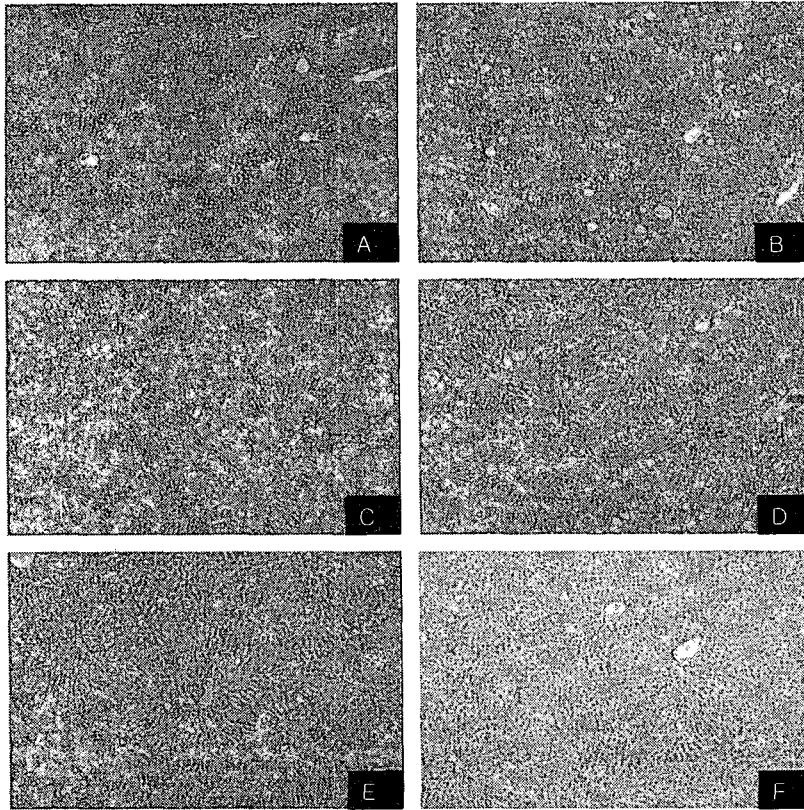


Fig. 3. Protective effects of melanian snail, *Artemisia iwayomogi*, melanian snail plus *Artemisia iwayomogi* extract, and Injinseulki on CCl₄-induced cell transformation in rat liver. Rats were pretreated with melanian snail (300 mg/kg, p.o., C), *Artemisia iwayomogi* (300 mg/kg, p.o., D), melanian snail plus *Artemisia iwayomogi* (300 mg/kg, p.o., E), and Injinski (300 mg/kg, p.o., F) for 1 weeks (one time/day), and then treated with CCl₄ (2 times/week, i.p.) and the indicated extracts (one time/day, p.o.) for 4 weeks). Negative (A) or positive (B) control rats were given saline or CCl₄ alone. The rats were killed 4 weeks after CCl₄ and extract administration. Liver tissues were stained with H&E.

이에 섬유가교 (portal to portal(P-P bridging)가 형성되고 전 문맥으로 섬유소 팽창이 되었으나 간 섬유소 생성이 억제되었고 (Fig. 4C), 인진쑥 추출물의 경우도 섬유 셉타 (fibrous septa)가 약간 있거나 없이 대부분 문맥주위에 섬유소가 있을 뿐 양성 대조군에 비해 현저히 억제되었다

(Fig. 4D). 그리고 다슬기와 인진쑥 혼합 추출물의 경우는 Fig. 4E와 같이 스코어 1로 섬유소 형성이 크게 억제되었으며, Fig. 4F에서 나타낸 인진슬기 투여군은 정상조직과 비슷한 소견을 보여주어 사염화탄소의 간섬유화 진행과정을 차단하는 뛰어난 효과가 있었다. 또한 각 실험군 마다 10마

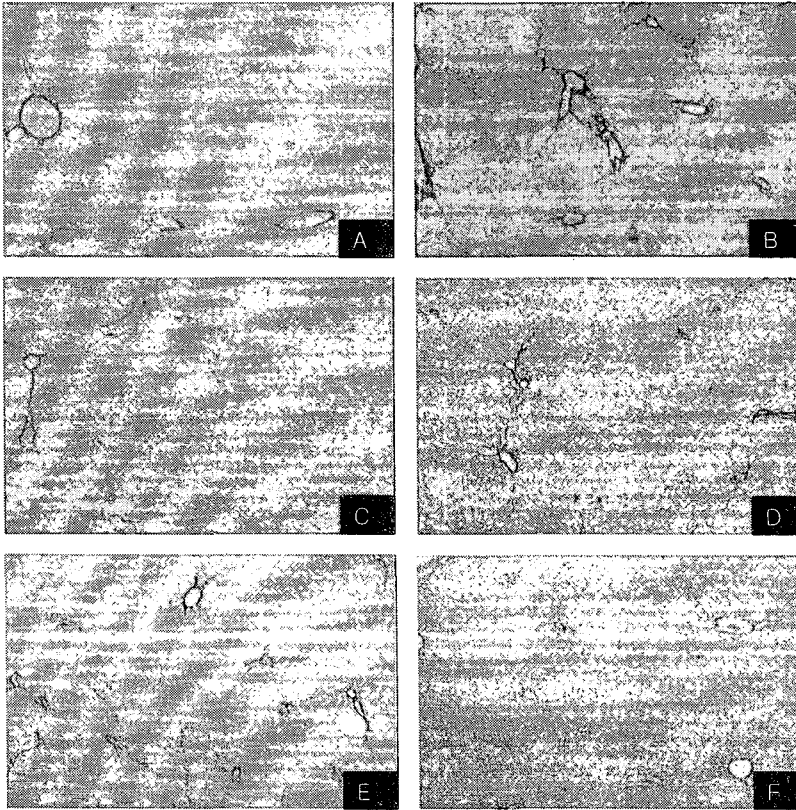


Fig. 4. Inhibitory effects of melanian snail, *Artemisia iwayomogi*, melanian snail plus *Artemisia iwayomogi* extract, and Injinseulki on CCl₄-induced fibrosis in rat liver. Rats were treated with melanian snail (C), *Artemisia iwayomogi* (D), melanian snail plus *Artemisia iwayomogi* (E), and Injinseulki (F) as described in Fig. 3. Negative (A) or positive (B) control rats were given saline or CCl₄ alone. Liver tissues were stained with Sirius red.

리를 대상으로 간 조직을 검경하여 약물에 따른 간 섬유화 억제에 대한 평가는 Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 인진슬기 투여군에서 가장 뚜렷한 간섬유화 억제 현상을 보였다.

간 섬유화(hepatic fibrosis)는 간경화(liver cirrhosis)의 전 단계로서 만성 간질환을 가진 환자에서 extracellular matrix protein(EMP), 특히 콜라겐의 과도한 축적

으로 발생되는데, 간이 손상되면 stellate cell은 상처를 봉입하기 위해서 활성화되고 계속적으로 증식하면서 myofibroblast-like cell로 변형되고, 이러한 과정에서 cellular ratinoid가 소실되면서 α -smooth muscle actin (α -SMA)이 합성되고 콜라겐(타입 I, II, III), fibronectin, laminin, 및 proteoglycan과 같은 EMP를 과량 생산한다. 이와 같이 EMP가 과량 생산되면서 간

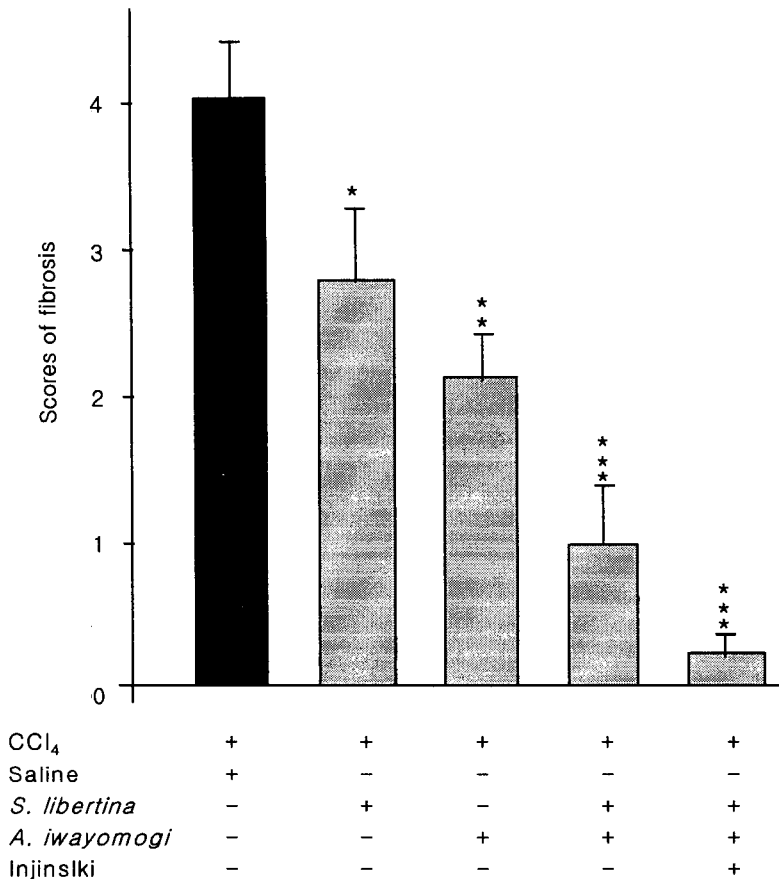


Fig. 5. Inhibitory effects of melanian snail, *Artemisia iwayomogi*, melanian snail plus *Artemisia iwayomogi* extract, and Injinseulki on CCl₄-induced fibrosis in rat liver. Rats were treated with CCl₄ or CCl₄ plus a various extracts as described in Fig. 3. Liver tissues were stained with Sirius red. A numerical scoring system for grading hepatic fibrosis was determined by method of Ishak et al.,²⁹⁾

섬유화가 계속적으로 진행되고, nodule이 형성되면서 간경화에 이른다¹⁾⁻⁹⁾. 특히 간섬유화는 GSH의 고갈에 의한 해독작용의 실패 또는 cytochrome C P450(CYP450)의 발현 및 Kupffer cell과 염증반응으로부터 유입된 면역세포에 의해 nitric oxide(NO), superoxide anion(O₂⁻), peroxy-nitrate와 같은 자유 유리기(free radical)에 의해 유

발된다¹⁾. 최근 식물 유래 항산화제의 관심이 높아지면서 이와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 일본에서는 Sho-saiko-to (TJ-9)을 대상으로 간섬유화 억제 기전에 대한 연구가 밝혀지면서 중국을 비롯한 여러 나라에서 식물성 유래 항산화제와 관련된 간질환 연구가 활발히 수행되고 있다¹⁹⁾⁻²¹⁾.

이러한 점을 감안하여 본 연구에서 사용된 생약은 인진쑥, 지구자, 백작약, 당기, 황정, 감초, 대추, 계피, 건강 및 치자 등의 가용성 농축액이다. 인진쑥은 쿠마린계열 화합물인 스코폴레틴을 다량함유하고 있어 강력한 항염증 효과가 있는 것으로 알려졌고³⁰⁾, 지구자는 플라보노이드계열 항산화제가 풍부하고 알콜성 간질환, 사염화탄소 또는 디-갈락토사민/리포폴리사카라이드(D-galactosamine/lipopolysaccharide) 처리시 간 손상으로부터 간 보호 효과가 있는 것으로 알려졌다³¹⁾.

또한 마늘의 경우 다이아릴 설페이트(diallyl sulfate)와 에스-머캅토시스테인(S-mecarptocysteine)이 풍부하게 들어있어, 항암효과는 물론 화학물질에 의해 유도된 간 손상을 보호할 수 있는 기능이 있는 것으로 최근에 알려졌다³²⁾. 감초는 글리시리친(glycyrrhizin)을 다량함유하고 있어 전립선암에 대한 항암효과, 기관지 확장 효과 및 간 손상 보호 효과 등이 보고되었다^{33),34)}. 황정은 그 잎이 항암효과가 있음이 보고되었으며³⁵⁾, 당귀는 NO 생성경로를 경유하여 프로스타글란딘 E2 (prostaglandin E2)의 생성을 억제하는 것으로 알려졌다³⁶⁾. 또한 대추는 일본에서 소시호탕의 구성성분 중의 하나로 간암을 보호하는 효과가 있고³⁷⁾, 치자는 알칼로이드계 화합물이 풍부하여 항균효과가 있으며³⁸⁾, 생강은 면역기능 조절자로 알려졌다³⁹⁾. 백작약은 아라키도닉산(arachidonic acid)의 형질전환을 유도하는 효과가 있고⁴⁰⁾, 계피는 사이클로옥시게네이스-2(cyclooxygenase-2, COX-2)를 억제하는 효과가 뛰어나다고 알려졌다⁴¹⁾.

따라서 인진슬기의 간섬유화 및 NO와 O₂⁻의 억제효과는 다슬기를 포함한 생약의

상호작용에 의한 것이라 추정할 수 있다. 그러나 이들에 대한 상세한 기전 규명은 앞으로 더 연구해야될 것으로 사료된다.

한편 인진슬기의 독성을 알아보기 위해서 실험군 당 BALB/c 계 마우스 20마리를 대상으로 인간(체중 60 kg)에 투여될 수 있는 하루 량 20g을 마우스 체중 kg당 0배, 1배, 10배, 50배를 1회 투여하여 급성독성과 1배와 10배로 나누어 이를 30일간 투여한 후 만성독성을 평가하였다. 사망률, 혈청 또는 플라스마내 AST 및 ALT를 평가함으로써 약물의 농도에 따른 독성을 평가하였다. 그 결과 급성독성평가의 경우 사용된 모든 농도에서 사망하지 않았고, 50 배 농도에서 만 ALT 및 AST가 대조군에 비해서 약간의 증가율을 보였다. 또한 만성평가의 경우에도 사망하지 않았고, ALT 및 AST의 경우에 있어서도 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과를 종합하면, 다슬기를 포함한 11가지의 생약성분으로 조성된 인진슬기는 간세포 변형억제, 간섬유화 억제, NO 및 O₂⁻의 생성능에 대한 억제 뿐만 아니라 간세포 보호에 유용하게 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 그러나 인진슬기의 간섬유화 억제에 대한 상세한 기전은 앞으로 연구해야할 과제로 남아 있다.

IV. 결 론

백서 RAW 264.7 또는 HepG2 세포를 대상으로 CCl₄ 유도 간 섬유화, IFN- γ 와 LPS 또는 PMA 유도-NO와 O₂⁻ 생성 및 tacrine 유도 간세포 손상 등에 대한 다슬기와 식물성 약용식물의 추출물인 인진슬

기의 억제 효과를 조사하였다. 에탄올가용성 다슬기 추출물은 tacrine으로 유도한 세포손상을 유의하게 억제하였다. 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서 인진슬기는 농도 의존적으로 NO와 O_2^- 생성을 억제하였다. 그리고 인진슬기는 화학물질로 유도된 간 섬유화를 현저하게 억제시켰다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 다슬기를 주요 성분으로 하는 식물성 약용식물 추출물로 조성된 인진슬기는 항 염증 및 항 섬유화에 대한 생물학적인 활성이 있음을 시사하고 간 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있을 것이라 사료된다. 그러나 이들에 대한 인진슬기의 약리적 효과 및 기전에 대해서는 앞으로 좀더 연구해야 할 과제로 남아 있다.

참 고 논 문

1. Arthur M.J.. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion*. 1998; 59: 376-380.
2. Rojkind M. and Dunn M.A.. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology*. 1979; 76: 849-863.
3. Poli G.. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 2000; 21: 49-98.
4. Gressner A.M. and Bachem M.G.. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 1990; 10: 30-46.
5. Hendriks H.F., Verhoofstad W.A., Brouwer A., de Leeuw A.M., Knook D.L.. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res*. 1985; 160: 138-149.
6. Schuppan D. and Porov Y.. Hepatic fibrosis: From bench to bedside. *Gastroenterol Hepatol*. 2002; 17 Suppl 3: S300-S305.
7. Gabele E., Brenner D.A., and Rippe R.A.. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci*. 2003; 8: D69-77.
8. Murphy F., Arthur M., and Iredale J.. Developing strategies for liver fibrosis treatment. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002; 11: 1575-585.
9. Kusunose M., Qiu B., Cui T., Hamada A., Yoshioka S., Ono M., Miyamura M., Kyotani S., and Nishioka Y.. Effect of Sho-saiko-to extract on hepatic inflammation and fibrosis in dimethylnitrosamine induced liver injury rats. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25: 1417-1421.
10. Guo M.Z., Li X.S., Xu H.R., Mei Z.C., Shen W., and Ye X.F.. Rhein inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23: 739-744.
11. Liu X., Huang M., Cheng N., Xiao W., and Wang Y.. Effects of genistein on the fenestrae, proliferation and nitric oxide synthesis of liver sinusoidal endothelial cells from carbon tetrachloride-induced experimental hepatic fibrosis rats. *Zhonghua Gan*

- Zang Bing Za Zhi. 2002; 10: 200-203.
12. Maher J.J.. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis.* 2001; 21: 417-426.
 13. Melgert B.N., Olinga P., Van Der Laan J.M., Weert B., Cho J., Schuppan D., Groothuis G.M., Meijer D.K., and Poelstra K.. Targeting dexamethasone to Kupffer cells: effects on liver inflammation and fibrosis in rats. *Hepatology.* 2001; 34: 719-28.
 14. Heller J., Sogni P., Barriere E., Tazi K.A., Chauvelot-Moachon L., Guimont M.C., Bories P.N., Poirel O., Moreau R., and Lebec D.. Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J Hepatol.* 2000; 33: 376-381.
 15. Kim K.Y, Choi I., and Kim S.S.. Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl4-induced fibrogenesis. *Mol Cells.* 2000; 10: 289-300.
 16. Iredale J.P., Murphy G., Hembry R.M., Friedman S.L., and Arthur M.J.. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest.* 1992; 90: 282-287.
 17. Milani S., Herbst H., Schuppan D., Grappone C., Pellegrini G., Pinzani M., Casini A., Calabro A., and Ciancio G.. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol.* 1994; 144: 528-537.
 18. Ohnishi N., Okada K., Yoshioka M., Kuroda K., Nagasawa K., Takara K., and Yokoyama T.. Studies on interactions between traditional herbal and western medicines. V. effects of Sho-saiko-to (Xiao-Cai-hu-Tang) on the pharmacokinetics of carbamazepine in rats. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25: 1461-1466.
 19. Akbar S.M., Yamamoto K., Abe M., Ninomiya T., Tanimoto K., Masumoto T., Michitaka K., Horiike N., and Onji M.. Potent synergistic effect of sho-saiko-to, a herbal medicine, during vaccine therapy in a murine model of hepatitis B virus carrier. *Eur J Clin Invest.* 1999 ; 29: 786-92.
 20. Shimizu I., Ma Y.R., Mizobuchi Y., Liu F., Miura T., Nakai Y., Yasuda M., Shiba M., Horie T., Amagaya S., Kawada N., Hori H., and Ito S.. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology.* 1999; 29: 149-160.
 21. Kayano K., Sakaida I., Uchida K., and Okita K.. Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 1998; 29: 642-649.

22. Yata Y., Gotwals P., Koteliansky V., and Rockey D.C.. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF-beta soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology*. 2002; 35: 1022-1030.
23. Chung H.T., Pae H.O., Choi B.M., Billiar T.R., and Kim Y.M.. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282: 1075-1079.
24. Miyasaka N., and Hirata Y.. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci*. 1997; 61: 2073-2081.
25. Wang Y., Vodovotz Y., Kim P.K., Zamora R., and Billiar T.R.. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 962: 415-422.
26. Goldstein S., Czapski G., Lind J., and Merenyi G.. Mechanism of Decomposition of Peroxynitric Ion (O(2)NOO(-)): Evidence for the Formation of O(2)(*-) and (*)NO(2) Radicals. *Inorg Chem*. 1998; 37: 3943-3947.
27. Olynyk J.K., and Clarke S.L.. Iron overload impairs pro-inflammatory cytokine responses by Kupffer cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 16: 438-444.
28. Pick E.. Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Methods Enzymol*. 1986; 132: 407-421.
29. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995; 22: 696-699.
30. Park E.J., Nan J.X., Kim J.Y., Kang H.C., Choi J.H., Lee S.J., Lee B.H., Kim S.J., Lee J.H., Kim Y.C., and Sohn D.H.. The ethanol-soluble part of a hot-water extract from *Artemisia iwayomogi* inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2000; 52: 875-881.
31. Hase K., Ohsugi M., Xiong Q., Basnet P., Kadota S., and Namba T.. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull*. 1997; 20: 381-385.
32. Hu J.J., Yoo J.S., Lin M., Wang E.J., and Yang C.S.. Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. *Food Chem Toxicol*. 1996; 34: 963-969.
33. Hsieh T.C., Lu X., Chea J., and Wu J.M.. Prevention and management of prostate cancer using PC-SPES: a scientific perspective. *J Nutr*. 2002; 132: 3513S-3517S.
34. Shim S.B., Kim N.J., Kim D.H.. Beta-glucuronidase inhibitory activity and hepatoprotective effect of 18 beta-glycyrrhetic acid from the rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis*.

- Planta Med. 2000; 66: 40-43.
35. Morita N., Arisawa M., and Yoshikawa A.. Studies on medicinal resources. XXXVIII. Studies constituents of Polygonatum plants (Liliaceae). (1). The constituents in the leaves of Polygonatum odoratum (Mill.) Druce var. pluriflorum (Mig.) Ohwi (author's transl)]. Yakugaku Zasshi. 1976; 96: 1180-1183.
36. Sheu J.R., Kan Y.C., Hung W.C., Lin C.H., and Yen M.H.. The antiplatelet activity of tetramethylpyrazine is mediated through activation of NO synthase. Life Sci. 2000; 67: 937-947.
37. Watanabe S., Kitade Y., Masaki T., Nishioka M., Satoh K., and Nishino H.. Effects of lycopene and Sho-saiko-to on hepatocarcinogenesis in a rat model of spontaneous liver cancer. Nutr Cancer. 2001; 39: 96-101.
38. Haginiwa J., Sakai S., Kubo A., Takahashi K., and Taguchi M.. [Gardneria alkaloids. IV. Comparative study of alkaloids on Gardneria nutans Sieb. et Zucc., G. multiflora Makino, G. shimadai Hayata and so-called G. insularis Nakai]. Yakugaku Zasshi. 1970; 90: 219-223.
39. Wilasrusmee C., Siddiqui J., Bruch D., Wilasrusmee S., Kittur S., and Kittur D.S.. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. Am Surg. 2002; 68: 860-864.
40. Umeda M., Amagaya S., and Ogihara Y.. Effects of certain herbal medicines on the biotransformation of arachidonic acid: a new pharmacological testing method using serum. J Ethnopharmacol. 1988; 23: 91-98.
41. Hong C.H., Hur S.K., Oh O.J., Kim S.S., Nam K.A., and Lee S.K.. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. J Ethnopharmacol. 2002; 83: 153-159.