

원 저

# 인진청간탕이 TGF-β1 매개성 간섬유화에 미치는 영향

심재옥, 김영철, 이장훈, 우홍정  
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

## Effects of *Injinchunggan-tang* (*Yinchenqinggan-tang*) on TGF-β1-Mediated Hepatic Fibrosis

Jae-Ok Shim, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

**Objectives :** The aim of this study was to characterize the effect of *Injinchunggan-tang* on TGF-β1-induced hepatic fibrosis.

**Methods :** mRNA and protein expression levels of TGF-β1 in *Injinchunggan-tang*-treated HepG2 cells were compared to untreated cells using quantitative RT-PCR and ELISA assay, respectively. mRNA expression levels of the TGF-β1 pathway genes (TR-1, TR-II, Smad2, Smad3, Smad4, and PAI-1) and fibrosis-associated genes (CTGF, fibronectin, and collagen type 1) were evaluated by quantitative RT-PCR. The effect of *Injinchunggan-tang* on cell proliferation of T3891 human fibroblast was evaluated using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay.

**Results :** Expression of TGF-β1 mRNA and protein was inhibited by *Injinchunggan-tang* in a dose- and time-dependent manner. Whereas TGF-β1-mediated induction of PAI-1 was suppressed by *Injinchunggan-tang*, expression of the TGF-β1 pathway genes such as TR-1, TR-II, Smad2, Smad3, and Smad4 was not affected by *Injinchunggan-tang* treatment. *Injinchunggan-tang* was found to inhibit TGF-β1-induced cell proliferation of T3891 human fibroblast, and also abrogated TGF-β1-mediated transcriptional up-regulation of CTGF, fibronectin, and collagen type I.

**Conclusions :** This study strongly suggests that the liver cirrhosis-suppressive activity of *Injinchunggan-tang* may be derived at least in part from its inhibitory effect on TGF-β1 functions, such as blockade of TGF-β1 stimulation of fibroblast cell proliferation and fibrosis-related gene expression as well as expression of TGF-β1 itself. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(2):1-11)

**Key Words:** *Injinchunggan-tang* (*Yinchenqinggan-tang*), TGF-β1, hepatic fibrosis

## 서론

우리나라는 바이러스성 肝炎의 이환율이 상당히 높고, 특히 B형肝炎 바이러스 보유율은 약 6-7%에 이르고 있으며 C형肝炎도 점점 증가하고 있는 추세이다<sup>1,2)</sup>. 바이러스성 肝炎은 흔히 만성화되고 肝硬變症이나 肝癌으로 진행되는데 이러한 각종 肝疾患은 우리나라 40-50代 男性 사망률을 높이는 주요 원인

· 접수 : 2003년 1월 14일 · 논문심사 : 2003년 2월 1일  
· 채택 : 2003년 4월 1일  
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 간계내과학교실  
(Tel: 958-9118, Fax: 958-9120 E-mail: hjwoo@khmc.or.kr)

이 되고 있다<sup>3)</sup>. 따라서 慢性 肝疾患은 개인은 물론 국민보건의 측면에서도 시급히 해결해야 할 문제이다.

TGF-β1(Transforming growth factor β 1)은 간세포의 플라겐생성과 세포의 단백질 생성을 촉진하는 사이토카인이다<sup>4,5)</sup>. 최근의 연구에 TGF-β1은 fibroblast의 성장과 collagen의 분비를 활성화함으로써 肝纖維化를 유도함이 확인되었다<sup>6,8)</sup>. 따라서 TGF-β1은 肝纖維化의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 인자로서 인식되기 시작하였으며, 이의 작용기전에 대한 분자생물학적 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>6,9,10)</sup>.

茵陳清肝湯은 清熱利濕시키는 茵陳五苓散<sup>11)</sup>에 肉桂를 除하고 地榆 覆盆子 蘿藦子 青皮 砂仁 등의 涼血止血 下氣行滯之劑를 가미한 처방으로 임상에서 바이러스성 慢性肝炎의 치료에 흔히 사용되고 있다. 茵陳清肝湯에 관한 연구로 金<sup>12)</sup>은 급성 및 아급성·만성 경구독성실험에서 약물의 안전성을 보고하였고, 金<sup>13)</sup>은 電激性肝炎을 일으킨 마우스의 생존을 증가를, 禹<sup>14)</sup>는 慢性B형肝炎 환자의 간기능 개선과 HBeAg의 陰轉率에 대한 임상보고를, 姜<sup>15)</sup>은 水浸 스트레스에 의한 肝硬變症에 대한 마우스의 간손상 회복과 진행억제를 보고하였다. 그러나 肝纖維化와 관련된 분자생물학적인 연구는 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 茵陳清肝湯이 TGF-β1 매개성 肝纖維化에 미치는 영향을 관찰하고자 TGF-β1 mRNA와 protein 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 간세포의 TGF-β1 signal pathway에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위해 TGF-β1 receptor type I(TβR-I), type II(TβR-II), Smad2, Smad3, Smad4 mRNA의 변화를 살펴봄과 동시에, TGF-β1 target gene 중 하나인 PAI-1 mRNA를 측정하였다. 그리고 纖維芽細胞를 이용하여 TGF-β1에 의하여 조절되는 것으로 알려진 肝纖維化 관련 인자들 즉, fibroblast 증식도, connective tissue growth factor(CTGF), fibronectin, collagen type Ia 등의 mRNA 발현 증가여부를 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해<sup>16)</sup>에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

#### Prescription of Injinchunnggan-tang

구성약물	생약명	용량
茵陳	Artemisiae Capillaris Herba	25g
地榆	Sanguisorbae Radix	8g
覆盆子	Rubi Fructus	6g
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	6g
豬苓	Polyporus	6g
白茯苓	Hoelen	6g
澤瀉	Alismatis Rhizoma	4g
蘿藦子	Raphani Semen	4g
青皮	Aurantii Immatri Pericarpium	3g
砂仁	Amomi Semen	3g
甘草	Glycyrrhizae Radix	3g
Total		74g

#### 2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 총 시료 740g(10척분량)을 3차증류수 4.8 l 로 2시간 동안 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 86.7g의 건조추출물을 얻어 11.71%의 수율을 보였다.

### 2. 방법

#### 1) HepG2 간세포에 대한 약물처리

茵陳清肝湯 처리에 의한 유전자발현 변화를 분석하기 위하여 1 x 10<sup>6</sup>/well의 세포에 茵陳清肝湯을 1, 10, 100 μg/ml 농도로 처리하였다. 처리 48시간 후 0.1% trypsin으로 세포를 회수하여 protein과 RNA를 추출하였다.

#### 2) 纖維芽細胞에 대한 藥物處理

TGF-β 1이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향과 TGF-β 1에 의해 그 발현이 촉진되는 CTGF, fibronectin, collagen type Ia의 mRNA 발현에 미치는

茵陳清肝湯의 영향을 분석하기 위하여 T3891 fibroblast에 茵陳清肝湯을 1, 10, 50, 100 μg/ml로 4시간 전처리하고 TGF-β 1 2ng/ml을 44시간 처리하였다.

## 실 험

### 1. 정량 RT-PCR

#### 1) RNA의 추출

##### ① GSS solution의 제작

250g의 guanidine isothiocyanate을 293ml 3차 증류수에 넣은 후 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 넣어 65℃에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다.

##### ② Solution D의 제작

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 넣어 제작하였다.

③ 10<sup>7</sup>개의 세포에 solution D 500μl, 2M sodium acetate(pH4.0) 50μl를 넣어 잘 혼합한 후 water-saturated phenol 500μl, chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 100μl를 넣어 10초간 vortexing하여 ice에 15분간 방치하였다.

④ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000μl를 넣어 -70℃에서 24시간 침전시켰다.

⑤ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA pellete을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30μl의 RNase-free water에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 양을 측정하였다.

#### 2) cDNA의 제작

① 다음과 같은 조성으로 시료를 혼합하였다.

Reverse transcriptase buffer	2 μl
Random hexamer (10 pM)	1 μl
AMV-RT (10U/μl)	1 μl
dNTP (10 pM)	1 μl
RNase inhibitor	0.5 μl
RNA	1 μl

② 혼합용액이 20μl가 되도록 sterile water를 첨가

한 후 42℃에서 15분간 방치하였다.

③ 각 시료에 80μl의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 이용하였다.

#### 3) Primer의 제작

##### ① House keeping gene

GAPDH : Glycerinaldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase

##### ② Target genes

TGF-β1

TGF-β type I receptor

TGF-β type II receptor

Smad2

Smad3

Smad4

PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-I)

CTGF (Connective tissue growth factor)

Fibronectin

Collagen type I alpha

#### 4) Quantitative RT-PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10x amplification buffer	10 μl
Mixture of dNTP (10 pM)	5 μl
GAPDH primer 1 (10 pM)	2 μl
GAPDH primer 2 (10 pM)	2 μl
Template cDNA	4 μl
H <sub>2</sub> O	77 μl

② GAPDH primer를 이용하여 다음 조건으로 34-38 cycles PCR반응을 시행하였다.

##### a. First cycle

Denaturation	5 min at 94℃
Annealing	1 min at 59℃
Polymerization	1 min at 72℃

##### b. Subsequent cycle (32-36 cycles)

Denaturation	1 min at 94℃
Annealing	1 min at 59℃
Polymerization	1 min at 72℃

c. Last cycle

Denaturation	1 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	10 min at 72°C

③ PCR products를 2% agarose gel에서 100V, 10분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 정량화 하였다.

④ 1차 PCR반응의 결과를 토대로 RNA의 양을 증감하여 모든 GAPDH PCR products의 양을 ±20%내로 정량화 하였다.

⑤ 위의 결과를 바탕으로 target 유전자에 대한 PCR 반응을 시행하여 상대적인 정량화를 시행하였다.

2. TGF-β1 ELISA

茵陳清肝湯이 인체 간세포주 HepG2의 TGF-β1 단백질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA 시스템(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)을 사용하여 TGF-β1 단백질을 정량분석하였다. HepG2 세포를 1 x 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하고 RPMI 배지에 각각의茵陳清肝湯 1, 10, 50, 100 μg/ml를 처리하여 48

시간 배양 후, 상청을 수집하여 biotin conjugated human TGF-β1 항체 50 μl와 검액 50 μl 혼합액, 키트에 제공된 스탠다드 TGF-β1 50 μl와 biotin conjugated human TGF-β1 항체 50 μl 혼합액을 각각 human TGF-β1 항체가 코팅된 플레이트에 넣고 상온에서 2시간 incubation한 후, horseradish peroxidase conjugated streptavidin을 tetramethyl benzidine(TMB) 기질과 함께 첨가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. [<sup>3</sup>H]Thymidine Incorporation Assay를 이용한 세포증식분석

세포의 DNA복제에 미치는茵陳清肝湯의 영향을 조사하기 위하여 [<sup>3</sup>H]Thymidine Incorporation Assay를 시행하였다. T3891 세포를 2 x 10<sup>4</sup> cells/well로 24-well multiplates에 seeding한 후 10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 TGF-β1 2 ng/ml을 처리하였다. 약물처리 20시간 후에 1.0 μCi/ml의 [<sup>3</sup>H]Thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)를 4

Prescription of *Injinchunnggan-tang*

Gene	Primer	Nucleotide sequences
GAPDH	S	(Sense 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3')
	AS	(Antisense 5'-GACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3')
TGF-β1	S	(Sense 5'-CACTTGCAGGAGCGCACGATCATG-3')
	AS	(Antisense 5'-TTTCCTGCTTCTCATGGCCACCCC-3')
TβR-I	RI-2	(Sense 5'-GTCCCCGGCTGCTCCTCCTCGTGCT-3')
	RI-3	(Antisense 5'-CCTGAGGCAGAACCTGACGTTGTCA-3')
TβR- II	RII-2	(Sense 5'-GAAGGCGCCGTCGTCGCT-3')
	RII-3	(Antisense 5'-AAGTCAGGATTGCTGGTGTATAT-3')
Smad2	2-S	(Sense 5'-GAGGTTCCGATAACAAGAGGCTGT-3')
	2-AS	(Antisense 5'-GCCTTGAGTTCATGACTGT-3')
Smad3	3-S	(Sense 5'-GGACGACTACAGCCATTCCA-3')
	3-AS	(Antisense 5'-TTCCGATGTGTCTCCGTGTCAG-3')
Smad4	4-1	(Sense 5'-GCTTCAGAAAATTGGAGACAT-3')
	4-2	(Antisense 5'-GATGCACGATTACTTGGTGG-3')
PAI-1	S	(Sense 5'-CTGTCTTTGGTGAAGGTCTGCT-3')
	AS	(Antisense 5'-TGTGTCTTCACCCAGTCATTGATG-3')
CTGF	S	(Sense 5'-AACCGTGGTTGGCCTGCCCTC-3')
	AS	(Antisense 5'-GTATGTCTTCATGCTGGTGCAG-3')
Fibronetin	FB-S	(Sense 5'-GGCCACTGTGTACAGACAGTG-3')
	FB-AS	(Antisense 5'-TGTGACCCATGTCATGCTGTGCT-3')
Collagen 1α	COL-S	(Sense 5'-AGCAGACGGGAGTTTCTCCTCG-3')
	COL-AS	(Antisense 5'-ACCTTGCCGTTGTCGCAGACGC-3')

시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다. TGF- $\beta$ 1에 의하여 촉진되는 세포증식에 미치는茵蔞清肝湯의 영향을 조사하기 위하여茵蔞清肝湯 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 TGF- $\beta$ 1 투여 4시간 전에 세포에 처리하였으며 세포증식의 변화유무를 대조군과 비교분석하였다.

### 성적

#### 1.茵蔞清肝湯이 HepG2의 TGF- $\beta$ 1 mRNA 합성에 미치는 영향

茵蔞清肝湯이 인체 간세포주 HepG2의 TGF- $\beta$ 1 mRNA 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2  $1 \times 10^5$  cells/well에 檢液 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 48시간 처리한 후, quantitative RT-PCR법으로 TGF- $\beta$ 1/GAPDH 비율을 분석한 결과 검액의 농도 의존적인 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현양의 감소가 관찰되었다 (Table 1).

檢液 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 12, 24, 48, 72시간 처리하여 분석한 결과 처리시간에 의존적인 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현

양의 감소가 관찰되었다(Table 2).

#### 2.茵蔞清肝湯이 HepG2의 TGF- $\beta$ 1 단백질 생성에 미치는 영향

檢液이 인체 간세포주 HepG2의 TGF- $\beta$ 1 단백질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2  $1 \times 10^4$  cells/well에 檢液 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 48시간 처리한 후, ELISA법을 이용하여 control의 TGF- $\beta$ 1 양을 500으로 정하고 처리군 TGF- $\beta$ 1의 상대값을 산출한 결과 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현에 대한 억제 효과와 동일하게 처리농도에 의존적인 TGF- $\beta$ 1 단백질의 생성 억제가 관찰되었다(Table 3).

#### 3.茵蔞清肝湯이 HepG2의 TGF- $\beta$ 신호전달기전관련 유전자 합성에 미치는 영향

檢液이 TGF- $\beta$  신호전달기전관련 유전자 (T $\beta$ R-I, T $\beta$ R-II, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA)의 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2  $5 \times 10^5$  cells/well에 檢液 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 를 48시간 처리한 후, quantitative RT-PCR로 target gene/GAPDH 비율을 분석한 결과 檢液은 T $\beta$ R-I, T $\beta$ R-II, Smad2, Smad3, Smad4 각각의 mRNA 發顯에는 영향을 미치

**Table 1.** Effect of *Injinchunggan-tang* on TGF- $\beta$ 1 mRNA Expression

Exp.	Control	Treated ( $\mu\text{g/ml}$ ; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	1.00 $\pm$ 0.00	0.86 $\pm$ 0.06	0.66 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.01

; Each value is mean  $\pm$  standard deviation.

; Each value represents relative ratio of TGF- $\beta$ 1/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 2.** Effect of *Injinchunggan-tang* on TGF- $\beta$ 1 mRNA Expression

Exp.	Control	Treated (hrs: 10 $\mu\text{g/ml}$ )			
		12	24	48	72
	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01

; Each value is mean  $\pm$  standard deviation.

; Each value represents relative ratio of TGF- $\beta$ 1/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 3.** Effect of *Injinchunggan-tang* on TGF- $\beta$ 1 Protein Expression

Exp.	Control	Treated ( $\mu\text{g/ml}$ ; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	500 $\pm$ 0.00	466.5 $\pm$ 6.36	410 $\pm$ 12.73	376.5 $\pm$ 10.61	306.5 $\pm$ 2.12

; Each value is mean  $\pm$  standard deviation.

; Each value represents relative volume of TGF- $\beta$ 1 of experimental groups when that of the control is set to 500.

지 않는 것으로 관찰되었다.

- 1) TβR-I expression(Table 4)
- 2) TβR-II expression(Table 5)
- 3) Smad2 expression(Table 6)
- 4) Smad3 expression(Table 7)
- 5) Smad4 expression(Table 8)

4.茵陳清肝湯이 TGF-β1 target gene PAI-1 mRNA 합성에 미치는 영향

檢液의 TGF-β1 합성억제에 대한 검증을 위해 TGF-β1의 target gene인 PAI-1 mRNA 합성에 미치는 영향을 조사하였다. HepG2 5 x 10<sup>5</sup> cells/well에檢

液 1, 10, 50, 100 μg/ml를 48시간 처리한 후 quantitative RT-PCR로 PAI-1/GAPDH 비율을 분석한 결과 檢液에 의한 TGF-β1 발현억제와 동일하게 TGF-β1의 target 유전자 PAI-1의 발현이 농도 의존적으로 감소됨이 관찰되었다(Table 9).

5.茵陳清肝湯이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향

檢液이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 T3891 human fetal lung fibroblast를 2 x 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 24-well multiplates에 배양하고,檢液 1, 10, 50, 100 μg/ml를 TGF-β1 투여 4시간 전

**Table 4.** Effect of *Injinchunggan-tang* on TβR-I mRNA Expression

Exp.	Control	Treated (μg/ml; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	1.00±0.00	1.04±0.09	1.00±0.04	0.99±0.08	1.07±0.03

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of TβR-I /GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 5.** Effect of *Injinchunggan-tang* on TβR-II mRNA Expression

Exp.	Control	Treated (μg/ml; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	1.00±0.00	1.00±0.11	1.01±0.08	1.02±0.06	0.97±0.04

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of TβR-II /GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 6.** Effect of *Injinchunggan-tang* on Smad2 mRNA Expression

Exp.	Control	Treated (μg/ml; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	1.00±0.00	1.03±0.09	1.04±0.02	1.07±0.07	1.05±0.01

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of Smad2/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 7.** Effect of *Injinchunggan-tang* on Smad3 mRNA Expression

Exp.	Control	Treated (μg/ml; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	1.00±0.00	0.95±0.02	0.98±0.09	1.03±0.05	1.04±0.02

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of Smad3/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 8.** Effect of *Injinchunggan-tang* on Smad4 mRNA Expression

Exp.	Control	Treated (μg/ml; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	1.00±0.00	1.00±0.11	1.03±0.01	1.05±0.08	1.00±0.08

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of Smad4/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 9.** Effect of *Injinchunggan-tang* on PAI-1 mRNA Expression

Exp.	Control	Treated ( $\mu\text{g/ml}$ ; 48 hrs)			
		1	10	50	100
	1.00±0.00	0.82±0.04	0.66±0.06	0.54±0.07	0.38±0.06

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of PAI-1/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 10.** Effect of TGF-β 1 and Combinations of TGF-β 1 and *Injinchunggan-tang* on T3891 Fibroblast Proliferation

Exp.	Control	TGF-β1(2 ng/ml)	IICGT ( $\mu\text{g/ml}$ ; 28 hrs)			
			1	10	50	100
	4950±354	6650±283	6025±35	5400±71	4925±247	4525±460

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents incorporated radioactivity of [3H]Thymidine when that of the control is set to 4950.

**Table 11.** Effect of *Injinchunggan-tang* on CTGF mRNA Expression

Exp.	Control	TGF-β1(2 ng/ml)	<i>Injinchunggan-tang</i> ( $\mu\text{g/ml}$ ; 28 hrs)			
			1	10	50	100
	1.00±0.00	2.40±0.31	2.02±0.18	1.79±0.22	1.42±0.13	1.13±0.01

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of CTGF/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 12.** Effect of *Injinchunggan-tang* on Fibronectin mRNA Expression

Exp.	Control	TGF-β1(2 ng/ml)	<i>Injinchunggan-tang</i> ( $\mu\text{g/ml}$ ; 28 hrs)			
			1	10	50	100
	1.00±0.00	1.84±0.06	1.81±0.13	1.48±0.18	1.26±0.08	1.06±0.06

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of fibronectin/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

**Table 13.** Effect of *Injinchunggan-tang* on Collagen Type I α mRNA Expression

Exp.	Control	TGF-β1(2 ng/ml)	<i>Injinchunggan-tang</i> ( $\mu\text{g/ml}$ ; 28 hrs)			
			1	10	50	100
	1.00±0.00	2.82±0.15	2.28±0.03	1.80±0.22	1.33±0.16	1.12±0.11

; Each value is mean ± standard deviation.

; Each value represents relative ratio of collagen type I α/GAPDH when that of the control is set to 1.00.

에 세포에 처리한 후, TGF-β1 2 ng/ml을 20 시간 처리하고 1.0 μCi/ml의 [3H]thymidine를 4시간 동안 pulse-labeling하여 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양 (CPM)을 liquid scintillation counter를 이용하여 측정한 결과 檢液의 투여로 TGF-β 1에 의해 유도 되는 fibroblast 세포 증식에 대한 억제작용이 농도 의존적으로 관찰되었다(Table 10).

fibronectin, collagen type I α mRNA 발현에 미치는 檢液의 영향을 알아보기 위해 T3891 human fetal lung fibroblast 5 x 10<sup>5</sup> cells/well에 檢液 1, 10, 50, 100 μg/ml를 TGF-β1 투여 4 시간전에 전처리하고 TGF-β1 2 ng/ml를 44시간 처리한 후, quantitative RT-PCR로 target gene/GAPDH 비율을 분석한 결과 TGF-β1에 의해 증가되는 CTGF, fibronectin, collagen type I α mRNA의 발현 억제작용이 농도 의존적으로 나타남이 관찰되었다.

6. 茵陳清肝湯이 T3891 fibroblast의 CTGF, fibronectin, collagen type I α 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향  
TGF-β 1에 의해 그 발현이 촉진되는 CTGF,

- 1) CTGF mRNA expression(Table 11)
- 2) Fibronectin mRNA expression(Table 12)
- 3) Collagen Type I α mRNA expression(Table 13)

## 고 찰

2001년 우리나라 統計廳 보고에 따르면 연령별 사망원인 중 간질환이 40代, 50代 男子에 있어 각각 2위를 차지하였고, 사망률순위 1위인 각종 癌 중에서 肝癌이 2위를 차지하는 등, 慢性 肝疾患에 의한 사망률은 매우 높은 것으로 보고되고 있어<sup>9)</sup> 개인은 물론 사회적으로도 중요한 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 질환의 중요한 원인이 되는 바이러스성 肝疾患 및 慢性 肝疾患에 대한 보다 효율적인 치료대책이 중요요제로 인식되고 있다.

肝硬變症에서 콜라겐 생성은 섬유아세포의 콜라겐 생성 증가와 기타 콜라겐 생성 세포수의 증가의 결과로 나타난다<sup>17-19)</sup>. 세포의 복원과정은 纖維母細胞의 증식과 콜라겐 및 기타 細胞外基質의 축적에 의해 이루어진다. 콜라겐은 동물에서 가장 흔한 단백질이며 모든 다세포 생물의 세포외기질을 이룬다. 창상치유 과정에서는 纖維母細胞에 의해서 콜라겐이 생성되고 축적된다. 정상조직에서 콜라겐의 대사는 생합성과 파괴의 균형을 유지한다. 콜라겐의 합성은 해당 유전자의 DNA 전사로부터 시작하여 mRNA를 거쳐 리보솜에서 알파 연쇄가 만들어짐으로서 시작된다. 알파 연쇄는 리보솜에서 떨어져 과립내형질망 내로 들어 오고 여기서 일련의 생화학적 변화가 일어나게 된다.

세포막에서 apoptosis를 유발하는 촉매의 역할을 하는 것으로 알려진 물질로는 Fas와 TGF- $\beta$ 1 등이 있다. 이 중 TGF- $\beta$ 1은 上皮細胞의 성장을 억제하는 것으로 널리 알려져 있는데 肝細胞, 前立腺細胞, 子宮上皮細胞 등에서 과발현시키면 apoptosis를 일으킨다. 이것은 정상 간세포에서는 발현되지 않으나 apoptosis가 일어나고 있는 간세포나 前癌(preneoplastic) 간세포에서는 발현되는 점 등으로 보아 생리학적 조절과정에서는 간세포 이외의 세포에서 발현되며 병적상태에서는 간세포 자체에서 발현되어 apoptosis를 유발하는 것으로 추측된다<sup>20)</sup>.

특히 최근의 연구에 의하면 TGF- $\beta$ 1은 fibroblast의 성장과 collagen의 분비를 활성화함으로써 肝纖維화를 유도함이 확인되었다<sup>6,9)</sup>. 따라서 TGF- $\beta$ 1은 肝纖維

化의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 인자로서 인식되기 시작하였으며, 이의 작용기전에 대한 분자생물학적 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>6,9,10)</sup>.

본 實驗에 사용된 茵陳清肝湯은 2000餘年前 張<sup>21)</sup>이 黃疸의 治療에 사용한 茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고 地榆 覆盆子 蘿藦子 青皮 砂仁을 加味한 方劑이며 現在 臨床에서 清熱利濕을 目標로 慢性肝疾患에 頻繁히 投與되고 있는 處方이다.

茵陳清肝湯은 黃疸, 積聚, 脹滿 등의 치료에 적용되는 清熱涼血 健脾益氣 滲濕利尿 등의 효능이 있어서 만성간질환에 적합한 처방으로 인식되는 바였고, 바이러스성 간질환에도 효과적일 것으로 기대되어 활용되기 시작한 方劑이다.

최근에는 肝疾患을 연구하는 방향이 분자생물학적인 접근 방법으로 전환되고 있다. 방법론적으로는 세포단위의 대사 및 apoptosis에 관여하는 단백질, DNA, RNA의 활성에 따라 발병원인과 전변과정의 상관성을 밝히려 하고 있다<sup>22,23)</sup>. 이에 대한 연구 보고로 朴<sup>24)</sup>은 茵陳清肝湯加味方이 apoptosis와 연관되는 Bcl-2, Bcl-XL 활성을 높여 apoptosis를 억제한다고 보고하였고, 洪<sup>25)</sup>은 茵陳清肝湯加味方이 etoposide에 손상된 간세포를 보호하고 Cpp32 protease를 억제하였으며 Cpp32, Fas를 억제하고 Bcl-2와 Bcl-XL을 촉진시킨다고 보고하였으며, 表<sup>26)</sup>은 茵陳四苓散이 Cpp32 protease를 감소시키고 Fas, Cpp32를 억제하며 Bcl-2와 Bcl-XL을 촉진시킨다고 보고하였고, 李<sup>27)</sup>는 茵陳의 분획물 중 butanol fraction에서 Fas를 매개로 하는 apoptosis에 대해 간세포 보호 효과가 가장 높다고 하였다. 高<sup>28)</sup>은 茵陳四苓散의 각 분획물은 HepG2 cell에서 간세포활성을 높이고 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포 손상을 억제하는 것으로 나타났으며 butanol 분획물에서 가장 현저한 것으로 보고하였고, 李<sup>29)</sup>는 茵陳의 butanol fraction이 간세포의 TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis에 관여하는 유전자를 조절함으로써 간기능을 보호하는 것으로 보고하였으며, 愼<sup>30)</sup>은 茵陳이 간세포를 대상으로는 TGF- $\beta$ 1 합성을 억제하였고 fibroblast를 대상으로는 세포증식과 섬유화유발 유전자의 발현을 억



제함을 관찰하였다. 이러한 연구를 통해 각종 肝疾患에 茵陳, 茵陳四苓散 등의 분획물을 다양하게 사용할 수 있는 근거와 간세포 보호 효과를 가진 신약 개발 가능성이 제시되었다.

본 실험에서는 TGF- $\beta$ 1 mRNA와 TGF- $\beta$ 1 protein, TGF- $\beta$ 1 signal pathway에 관련된 유전자(T $\beta$ R-I, T $\beta$ R-II, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA), TGF- $\beta$ 1의 target gene인 PAI-1 mRNA 및 肝纖維化 관련 유전자들(CTGF, fibronectin, collagen type I $\alpha$  mRNA)의 발현과 합성의 증가여부를 RT-PCR법으로 분석하였다.

본 실험에서 茵陳清肝湯을 HepG2 cell에 처리하여 TGF- $\beta$ 1 mRNA, protein 분비에 미치는 영향을 살펴본 결과 농도와 처리시간에 의존적으로 TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현량이 감소되어 인체 간세포의 TGF- $\beta$ 1 유전자 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단되었다. TGF- $\beta$ 1 protein 검사에서도 같은 결과를 보여 茵陳清肝湯은 인체 간세포의 TGF- $\beta$ 1 생성을 억제함으로써 TGF- $\beta$ 1에 의해 촉진되는 것으로 알려진 fibroblast의 증식 및 肝纖維化를 억제하는 효과를 가지고 있는 것으로 생각된다.

茵陳清肝湯이 간세포의 TGF- $\beta$ 1 signal pathway에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell에 처리하여 TGF- $\beta$ 1 signal pathway를 구성하는 주요인자들, 즉 TGF- $\beta$ 1 receptors, Smad2, Smad3, Smad4 등의 mRNA의 변화를 RT-PCR법을 이용하여 살펴본 결과 茵陳清肝湯은 T $\beta$ R-I mRNA 발현과 T $\beta$ R-II mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 반면, TGF- $\beta$ 1의 target gene인 PAI-1 mRNA 발현에는 있어서는 茵陳清肝湯에 의한 발현감소가 관찰되어 그 작용 부위가 target gene임을 시사하였다.

[<sup>3</sup>H]Thymidine Incorporation Assay 결과 TGF- $\beta$ 1에 의해 유도되는 fibroblast 세포증식촉진에 대한 억제 작용이 관찰되어 茵陳清肝湯이 TGF- $\beta$ 1 합성을 억제하는 성분과는 별개의 fibroblast 세포증식 억제성분을 함유하고 있을 가능성과 TGF- $\beta$ 1에 antagonist로 작용할 가능성을 시사하였다. 茵陳清肝湯이 TGF- $\beta$ 1에 의해 그 발현이 촉진되는 CTGF, fibronectin,

collagen type I $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 茵陳清肝湯 (1, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml)을 4시간 동안 처리한 후, TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)을 48 시간동안 처리하고 상기 유전자의 mRNA 발현도를 조사하였다. 茵陳清肝湯의 투여 결과 fibroblast 증식억제와 CTGF 발현억제와의 강한 상관성이 관찰되었다. Fibronectin mRNA 발현에 대하여는 慎<sup>30)</sup>의 茵陳분획물의 실험에서는 주목할 만한 영향이 관찰되지 않았으나 본 실험에서는 농도의존적으로 발현이 억제되어 單方보다 더욱 강한 억제작용을 시사하였다. Collagen type I $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향에서도 collagen type I $\alpha$  mRNA 발현의 감소효과가 관찰되어 茵陳清肝湯이 肝纖維化 억제의 효과를 가짐을 살펴볼 수 있었다.

이상에서 茵陳清肝湯은 간세포의 TGF- $\beta$ 1 합성을 억제함으로써 섬유화 유발 첫단계 물질 생성을 억제함이 확인되었다. 또한 纖維芽細胞의 증식 및 섬유화 유발 유전자의 발현을 억제함으로써 이차적으로 섬유화 억제 작용이 있음이 관찰되었다. 따라서 茵陳清肝湯은 간조직의 섬유화를 억제하여 肝硬變症의 진행을 방지하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

## 결론

茵陳清肝湯이 간세포의 TGF- $\beta$ 1 매개성 섬유화에 미치는 영향을 확인하고자 TGF- $\beta$ 1 ELISA assay, Thymidine Incorporation assay를 시행하고, 각 유전자의 발현을 파악하기 위하여 quantitative RT-PCR을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 茵陳清肝湯은 간세포의 TGF- $\beta$ 1 mRNA 및 protein 발현을 농도 및 시간에 비례하여 억제하였다.
2. 茵陳清肝湯은 TGF- $\beta$ 1에 의해 활성화되는 간세포의 signal pathway 중 target gene인 PAI-1 mRNA 발현을 억제하였으나, TGF- $\beta$ 1 수용체 및 세포벽에서 핵까지 신호를 전달하는 Smad2,3,4 유전자에는 영향을 미치지 않았다.
3. 茵陳清肝湯은 TGF- $\beta$ 1에 의하여 촉진되는 fibroblast의 세포증식을 억제하였다.

4. 茵陳清肝湯은 간섬유화와 밀접한 관련이 있는 CTGF와 fibronectin 및 collagen type I $\alpha$  mRNA의 발현을 억제하였다.

이상에서 茵陳清肝湯은 TGF- $\beta$ 1 합성을 억제하였고, fibroblast의 증식과 섬유화유발 유전자 발현을 억제함이 확인되었다.

이는 茵陳清肝湯이 임상에서 바이러스성 肝硬變症의 치료에 다양하게 활용될 수 있는 학술적 근거를 제시한 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 정영화. B형 만성간염에 대한 항바이러스 요법의 현재와 미래. 내과학의 최신지견. 1999:77-80.
2. 김정룡. 소화기계 질환. 서울:일조사. 2000:497,540.
3. 통계청. 2000년도 사망원인통계결과. 2001:1-36.
4. Sheila Sherlock, James Dooley. Diseases of the Liver and Biliary System. Blackwell Scientific Publications. 1993:357-359.
5. Ades EW, Hooper C, Pruckler JM. Cyto-reductive therapy of multidrug-resistant hepatocellular carcinoma: negative regulation of growth using combination differentiation therapy. Pathobiology. 1992;60(1):45-48.
6. Rui MS, Pamela N, Silvia DE, Mara AZ. TGF- $\beta$  isoforms in alcoholic liver disease. J Gastroenterol. 1998;33:383-389.
7. Matthew RD, Ken SF, Susan A, Shawn W, Helene K, Xinfan H, Gary RG. Connective tissue growth factor mediated transforming growth factor  $\beta$ 1-induced collagen synthesis: down regulation by cAMP. the FASEP J. 1999;13:1774-1786.
8. Nancy S, Valentian F, Peter N, Jeffrey K, Paturu K, Lalage W, Anita BR, Michael BS, Snorri ST. Hepatic expression of mature transforming growth factor  $\beta$ 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. Proc Natl Acad Sci. 1995;92:2572-2576.
9. Jacob G, Dominique R, Victor EK, Montgomery B. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor  $\beta$  type II receptor: A potential new therapy for hepatic fibrosis. PNAS. 1999;96(22):12719-12724.

10. Stephan K, Ansgar WL, Andrea K, Jurgen H, Hans PD, Peter S, Stefan RJ, Karl HM, Manfred B. TGF- $\beta$ 1 in liver fibrosis-an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. the Americal Physiology Society. 1999;1059-1068.
11. 張仲景. 金匱要略. 서울:杏林書院. 1984:392-394.
12. 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕의 안전성에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1997;20(1):57-89.
13. 김진주. 인진청간탕이 MHV-2로 유발된 마우스의 손상간에 미치는 영향. 서울:경희대학교대학원. 1996.
14. 禹弘楨. 慢性B型肝炎에 대한 茵陳清肝湯의 效果. 第2回 韓·中 學術大會 參加論文集 -肝臟編-. 大韓韓醫師協會. 1995:18-53.
15. 강경태, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 實驗的 環쥐의 肝硬變症에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 1997;20(2):133-150.
16. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울:한국메디칼인텍스사. 1998:638
17. Gandhi CR, Kuddus RH, Uemura T, Rao AS. Endothelin stimulates transforming growth factor-beta1 and collagen synthesis in stellate cells from control but not cirrhotic rat liver. Eur J Pharmacol. 2000;406(3):311-318.
18. Lieber CS. Prevention and treatment of liver fibrosis based on pathogenesis. Alcohol Clin Exp Res. 1999;23(5):944-9.
19. Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K, Sasaki M, Gershwin ME, Nakanuma Y. Immunohistochemical analysis of cell-matrix adhesion molecules and their ligands in the portal tracts of primary biliary cirrhosis. J Pathol. 2000;190(1):93-9.
20. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267: 1456-1462.
21. 張仲景. 仲景全書. 서울:대성문화사. 1984:225, 240, 249, 250, 408, 411.
22. Leist M, Gartner F, Naumann H, Bluthmann H, Voget K, Brigelrus-Flohe R, Nicotera P, Volk H.D, and Wendel A. Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. Gastroenterology. 1997;112: 923-934.
23. Lin D, Fiscella M, O' Connor P.O, Jackman J. J, Chen C, Luo Ling L, Sala A, Travali S, Appella E, Mercer E. Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest. Proc. Natl.

- Acad. Sci., USA. 1994;91(21): 10079-10083.
24. 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 肝細胞의 增殖能力에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1998;19(1):145-164.
  25. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯加味方이 肝細胞 活性細胞週期 및 apoptosis에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1998;19(2):337-372.
  26. 표임정. 茵陳四苓散이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1999;22(1): 119-140.
  27. Yi Jong-Hoon, Lee Jang-Hoon, Woo Hong-Jung. Effects of Five Fraction of Artemisia Capillaris THUMB on Fas-mediated Apoptosis in HepG2 Cells. Journal of Oriental Medicine. 1999;4(1):41-45.
  28. 고흥. 인진사령산 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-Mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(3):174-185.
  29. 이지현. 인진분획물이 인체간세포의 TGF- $\beta$ 1 induced apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2000; 20(1):53-61.
  30. 신상만. 茵陳이 TGF-B1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2001;22(3):141-155.