

淸肝解酒湯이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향

이지현, 이장훈, 김영철, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effect of *Chungganhaeju-tang* on TGF-β1-induced Hepatic Fibrosis

Ji-Hyeon Lee, Jang-Hoon Lee, Young-Chul Kim, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

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

Materials and Methods: mRNA and protein expression levels of TGF-β1 in *Chungganhaeju-tang* treated HepG2 cells were compared to untreated cells using quantitative RT-PCR and ELISA assay, respectively. mRNA expression levels of the TGF-β1 signaling pathway genes (TβR-1, TβR-II, Smad2, Smad3, Smad4, and PAI-1) and fibrosis-associated genes (CTGF, fibronectin, and collagen type 1α) were evaluated by quantitative RT-PCR. The effect of *Chungganhaeju-tang* on cell proliferation of T3891 human fibroblast was evaluated using [³H]Thymidine Incorporation Assay.

Results: Inhibition of TGF-β1 mRNA expression and protein production was observed with treatment of *Chungganhaeju-tang* and seen to be dose and time dependent. Whereas TGF-β1-mediated induction of PAI-1 was suppressed with treatment of *Chungganhaeju-tang*, expression of the TGF-β1 signaling pathway genes such as TβR-1, TβR-II, Smad2, Smad3, and Smad4 was not affected. With treatment of *Chungganhaeju-tang*, inhibition of TGF-β1-induced cell proliferation of T3891 human fibroblast was observed, as well as abrogation of TGF-β1-mediated transcriptional up-regulation of CTGF, fibronectin, and collagen type 1α.

Conclusion: This study strongly suggests that the liver cirrhosis-suppressive activity of *Chungganhaeju-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.

Key Words: *Chungganhaeju-tang*, hepatic fibrosis, TGF-β1

1. 緒 論

최근 우리나라는 생활양식의 서구화, 사회문화적 변화 등으로 인해 알코올 소비량이 늘어나고 있다¹. 알코올 소비의 증가 추세는 알코올성 간질환의 발생 빈도와 밀접하게 관련되며, 최근 연구에서는 우리나라 간경변증 가운데 알코올성 간경변증이 30-38%를 차지할 정도로 그 비율이 현저히 증가하

고 있음을 보여주고 있다^{2,4}.

알코올성 간질환의 발생기전에 관한 분자생물학 및 세포생물학적 연구들이 진행됨에 따라 새로운 병리기전들이 밝혀지고 있고 그 기전에 근거한 다양한 치료방법들에 대한 연구가 진행되고 있으나 아직 통용되는 치료법은 제시되지 못하고 있는 실정이다^{5,6}. 따라서 알코올성 간질환에 대한 근본적인 관리 및 치료대책이 필요한 실정이다.

淸肝解酒湯은 對金飮子에 茵陳四苓散을 合方하고 解酒毒의 要藥인 葛根, 赤楊 등을 가미하여 立方한 것으로 임상에서 알코올성 간질환의 치료에 빈 용되고 있다.

· 접수 : 2005. 1. 20 · 채택 : 2005. 2. 17
· 교신저자 : 이장훈, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118 Fax. 02-958-9120
E-mail : hjwoo@khu.ac.kr)

淸肝解酒湯에 대한 연구로는, 알코올성 간손상에서 각종 생화학적 지표를 정상화시키고^{7,8}, 임상증상을 개선시키는 효과가 입증된 바 있으며⁸, 최근에는 알코올 대사관련 유전자의 발현과 TNF-α, IL-1β 등 사이토카인 발현에 영향을 미치고^{9,10}, 항산화효소인 glutathione의 생성¹¹과 전사(transcription)조절인자인 NFκB를 활성화시킴으로써¹² 알코올 유도성 apoptosis를 억제하고 간세포 활성을 높여 간보호작용이 있음이 확인된 바 있다.

TGF-β1(Transforming growth factor β1)은 세포의 성장과 분화를 조절하는 사이토카인으로¹³, 최근 연구에서는 fibroblast의 성장과 collagen의 분비를 활성화함으로써 간섬유화를 유도함이 확인되어¹⁴ 간섬유화의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 인자로서 인식되기 시작하였으며, 이의 작용기전과 TGF-β1의 신호전달계에 대한 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있다.

이에 저자는 淸肝解酒湯이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 TGF-β1 mRNA 발현과 단백질 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 간세포의 TGF-β1 신호전달기전에 관련된 유전자 발현을 관찰함과 동시에, TGF-β1 target gene인 PAI-1(Plasminogen activator inhibitor-1)의 mRNA 발현을 관찰하였다. 그리고 섬유아세포를 이용하여 TGF-β1에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있는 간섬유화 관련 인자들의 mRNA 발현 증가여부와 세포증식도를 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹⁵에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

Prescription of *Chungganhaeju-tang* (CGHJT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	30
陳皮	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>	12
葛根	<i>Puerariae Radix</i>	12
赤楊	<i>Alny Cortex et Ramulus</i>	12
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	8
茯苓	<i>Hoelen</i>	8
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	8
豬苓	<i>Polyporus</i>	8
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	8
砂仁	<i>Amomi Semen</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
Total amount		118

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 淸肝解酒湯 1첩 분량(118g)을 3차 증류수 500ml에 혼합하여 90ml가 될 때까지 가열, 농축시키고 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80℃ 물 중탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기(Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 32.4g의 건조추출물을 얻어 27.46%의 수율을 보였다. 얻어진 추출물을 DMEM 배지 110 ml에 더하여 37℃에서 3시간 동안 섞었다. 1500rpm으로 20분간 원심분리하여 남아있는 시료를 제거한 상층액을 0.45μm 필터(Millipore사)로 여과하여 멸균하고 4℃에 저장하였다.

2. 방법

1) 간세포에 대한 약물처리

淸肝解酒湯이 인체 간세포의 TGF-β1 mRNA와 protein 및 신호전달기전 관련유전자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 세포를 1x 10⁵/well의 밀도로 배양한 후 우선 淸肝解酒湯을 1, 10, 50, 100 μg/ml의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 淸肝解酒湯이 TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향을 처리시간별로 자세히 분석하기 위하여 淸肝解酒湯을 10 μg/ml의 농도로 하여 HepG2 세포에 12, 24, 48, 72시간 동안 처리하였다. 淸肝解酒湯이 TGF-β1

target gene 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 세포에 淸肝解酒湯을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 4시간 전처리한 후, porcine TGF- β 1 (R&D) 2 ng/ml로 48시간 동안 처리하여 정상 대조군 및 TGF- β 1만 처리한 군과 비교하였다.

2) 섬유아세포에 대한 약물처리

淸肝解酒湯이 fibroblast 세포증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 약물처리를 하지 않은 대조군과 T3891 fibroblast에 淸肝解酒湯 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 48시간 처리한 실험군을 비교하였다. 淸肝解酒湯이 TGF- β 1에 의한 fibroblast 증식유도에 미치는 영향과 TGF- β 1에 의해 그 발현이 촉진되는 유전자 (CTGF, fibronectin, collagen type I α)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 T3891 fibroblast에 淸肝解酒湯 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 4시간 전처리한 후 TGF- β 1 2 ng/ml을 48시간 처리하여, 정상 대조군 및 TGF- β 1만 처리한 군과 비교하였다.

III. 實 驗

1. 정량적 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

1) RNA의 추출

① GSS solution의 제작

250g의 guanidine isothiocyanate을 293ml의 3차 증류수에 넣은 후 여기에 다시 0.75M sodium citrate 17.6ml와 10% sarkosyl 26.4ml를 넣어 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 stirring한 후 여과하여 멸균하였다.

② Solution D의 제작

GSS solution에 2-mercaptoethanol을 0.1M의 농도로 넣어 제작하였다.

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

④ 혼합용액을 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 4/5를 회수하여 동량의 cold isopropanol 1000 μl 를 넣어 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 침

전시켰다.

⑤ 15000rpm에서 20분간 원심분리하여 용액을 제거한 후 RNA 침전물을 100% ethanol과 70% ethanol로 세척한 후 30 μl 의 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 μg

② 혼합용액이 20 μl 가 되도록 sterile water를 첨가한 후 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 방치하였다.

③ 각 시료에 80 μl 의 물을 넣어 혼합한 후 PCR 반응에 사용하였다.

3) Primer의 제작

① House keeping gene

Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase : GAPDH

② Target genes

TGF- β 1

TGF- β type I receptor : T β R-I

TGF- β type II receptor : T β R-II

Smad2

Smad3

Smad4

Plasminogen activator inhibitor-1 : PAI-1

Connective tissue growth factor : CTGF

Fibronectin

Collagen type Ia

4) Quantitative RT-PCR

① 각 cDNA를 대상으로 다음과 같이 시료를 혼합하였다.

10x amplification buffer	10 μl
Mixture of dNTP (10 pM)	5 μl

Primer 1 (10 pM)	2 μl
Primer 2 (10 pM)	2 μl
Template cDNA	4 μl
H2O	77 μl

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

a. First cycle

Denaturation	5 min at 94°C
Annealing	1 min at 59°C
Polymerization	1 min at 72°C

b. Subsequent cycle (32-36 cycles)

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

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, 10 분간 전기영동한 후 densitometer를 이용하여 각 band의 밝기를 정량화하였다.

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

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

2. ELISA를 이용한 TGF-β1 단백질의 생성 분석
 清肝解酒湯이 HepG2의 TGF-β1 단백질 생성에

Oligonucleotide primer sequences used for quantitative RT-PCR analysis
 (All sequences are listed 5' to 3')

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'-GAAGGCGCCGTCCGTGCGCT-3')
	RII-3	(Antisense 5'-AAGTCAGGATTGCTGGTGTATAT-3')
Smad2	2-S	(Sense 5'-GAGGTTTCGATACAAGAGGCTGT-3')
	2-AS	(Antisense 5'-GCCTTGAGTTCATGATGACTGT-3')
Smad3	3-S	(Sense 5'-GGACGACTACAGCCATTCCA-3')
	3-AS	(Antisense 5'-TTCCGATGTGTCTCCGTGTCAG-3')
Smad4	4-1	(Sense 5'-GCTTCAGAAATTGGAGACAT-3')
	4-2	(Antisense 5'-GATGCACGATTACTTGGTGG-3')
PAI-1	S	(Sense 5'-CTTGTCTTTGGTGAAGGGTCTGCT-3')
	AS	(Antisense 5'-TGTGTCTTACCCAGTCATTGATG-3')
CTGF	S	(Sense 5'-AACCGTGGTTGGGCCTGCCCTC-3')
	AS	(Antisense 5'-GTATGTCTTCATGCTGGTGCAG-3')
Fibronectin	FB-S	(Sense 5'-GGCCACTGTGTACAGACAGTG-3')
	FB-AS	(Antisense 5'-TGTGACCCATGTCATGCTGTGCTT-3')
Collagen type Ia	COL-S	(Sense 5'-AGCAGACGGGAGTTTCTCCTCG-3')
	COL-AS	(Antisense 5'-ACCTTGCCGTTGTGCGCAGACGC-3')

미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA 시스템 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)을 사용하여 TGF-β1 단백질을 정량분석하였다. HepG2 세포를 1 x 10⁵ cells/well로 분주하고 RPMI 1640 배지에 清肝解酒湯 1, 10, 50, 100 μg/ml를 처리하여 48시간 배양 후, 상청액을 수집하여 biotin conjugated human TGF-β1 항체 50 μl와 검액 50 μl 혼합액, kit에 제공된 standard TGF-β1 50 μl와 biotin conjugated human TGF-β1 항체 50 μl 혼합액을 각각 human TGF-β 항체가 코팅된 plate에 넣고 상온에서 2시간 incubation한 후, horseradish peroxidase conjugated streptavidin을 tetramethyl benzidine(TMB)기질과 함께 첨가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. [³H]Thymidine Incorporation Assay를 이용한 세포 증식 분석

Fibroblast의 DNA 복제에 미치는 清肝解酒湯의 영향을 조사하기 위하여 [³H]Thymidine Incorporation Assay를 시행하였다. T3891 세포를 1 x 10⁵ cells/well로 24-well multiplates에 분주한 후

10% serum이 첨가된 배지로 24시간 동안 배양하였다. PBS(Phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후 serum-free 배지로 교환함과 동시에 TGF-β1 2 ng/ml을 처리하였다. 약물처리 20시간 후에 1.0 μCi/ml의 [³H]Thymidine (Amersham, Arlington Heights, IL)을 4시간 동안 pulse-labeling 하였고 DNA내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양은 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

TGF-β1에 의하여 촉진되는 fibroblast증식에 미치는 清肝解酒湯의 영향을 조사하기 위하여 TGF-β1 투여전에 清肝解酒湯 1, 10, 50, 100 μg/ml을 세포에 4시간 전처리하였으며 세포증식의 변화유무를 대조군과 비교분석하였다.

IV. 結果

1. 清肝解酒湯이 HepG2의 TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향

清肝解酒湯이 인체 간세포주 HepG2의 TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해

Table 1. Effect of CGHJT on TGF-β1 mRNA Expression

	Control	CGHJT treated(μg/ml; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp.1	1.00	0.82	0.62	0.47	0.38
Exp.2	1.00	0.84	0.63	0.42	0.33

; Each value represents relative ratio of TGF-β1/GAPDH when that of the control, CGHJT untreated, is set to 1.00.

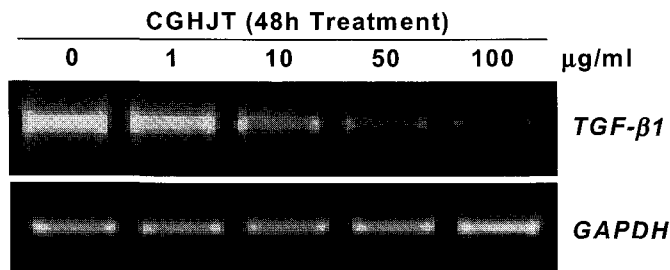


Fig. 1. Quantitative RT-PCR analysis of TGF-β1 mRNA expression in HepG2 cells treated with CGHJT.

HepG2 1×10^5 cells/well에 淸肝解酒湯 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 48시간 처리한 후 quantitative RT-PCR로 TGF-β1/GAPDH 비율을 분석한 결과, TGF-β1 mRNA 발현양은 약물의 처리농도에 의존적으로 감소하였다(Table 1, Fig. 1). 처리시간별 분석을 위해 淸肝解酒湯 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 12, 24, 48, 72시간 처리한 후 TGF-β1/GAPDH 비율을 분석한 결과, TGF-β1 mRNA 발현양도 약물의 처리시간에 의존적으로 감소하였다(Table 2, Fig. 2).

2. 淸肝解酒湯이 HepG2의 TGF-β1 단백질 생성에 미치는 영향

淸肝解酒湯이 인체 간세포주 HepG2의 TGF-β1 단백질 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해

HepG2 1×10^5 cells/well에 淸肝解酒湯 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 48시간 처리한 후, ELISA법을 이용하여 대조군의 TGF-β1양을 500으로 정하고 처리군 TGF-β1의 상대값을 산출한 결과, TGF-β1 mRNA 발현 억제효과와 동일하게 약물의 처리농도에 의존적인 TGF-β1 단백질의 생성억제가 관찰되었다 (Table 3, Fig. 3).

3. 淸肝解酒湯이 HepG2의 TGF-β1 신호전달기전 관련유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향

淸肝解酒湯이 TGF-β1 신호전달기전 관련유전자 (TβR-I, TβR-II, Smad2, Smad3, Smad4)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 1×10^5 cells/well에 淸肝解酒湯 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를

Table 2. Effect of CGHJT on TGF-β1 mRNA Expression

	Control	CGHJT treated(hrs; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		12	24	48	72
Exp.1	1.00	0.85	0.71	0.61	0.43
Exp.2	1.00	0.87	0.70	0.64	0.48

; Each value represents relative ratio of TGF-β1/GAPDH when that of the control, CGHJT untreated, is set to 1.00

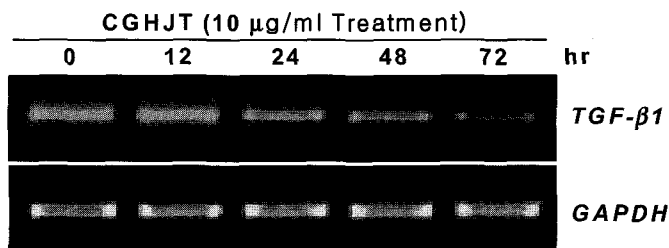


Fig. 2. Quantitative RT-PCR analysis of TGF-β1 mRNA expression in HepG2 cells treated with CGHJT.

Table 3. Effect of CGHJT on TGF-β1 Protein Synthesis

	Control	CGHJT treated ($\mu\text{g}/\text{ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp.1	500	422	364	284	210
Exp.2	500	428	370	269	188
Mean	500	425	367	277	199

; Each value represents relative volume of TGF-β1 of experimental groups when that of the control, CGHJT untreated, is set to 500

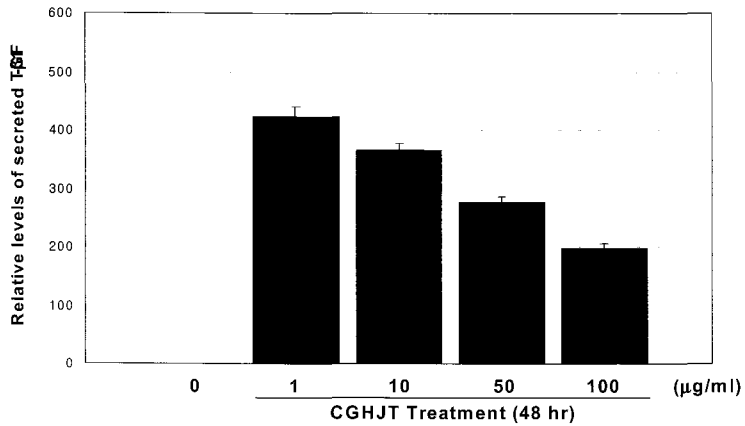


Fig. 3. Inhibition of TGF-β1 protein synthesis by CGHJT in HepG2 cells

Table 4. Effect of CGHJT on TGF-β1 Signaling Mediator mRNAs Expression

		Control	CGHJT Treated(µg/ml; 48 hrs)			
			1	10	50	100
TβR-I	Exp.1	1.00	0.92	0.92	1.03	1.05
	Exp.2	1.00	0.94	0.97	0.98	1.02
TβR-II	Exp.1	1.00	1.06	1.04	0.93	1.04
	Exp.2	1.00	1.01	0.96	1.04	0.95
Smad2	Exp.1	1.00	0.94	0.94	1.07	0.99
	Exp.2	1.00	0.98	1.02	0.98	1.04
Smad3	Exp.1	1.00	1.03	1.04	1.02	0.95
	Exp.2	1.00	0.99	1.02	1.05	1.02
Smad4	Exp.1	1.00	0.92	0.99	0.95	0.98
	Exp.2	1.00	0.98	0.93	1.04	0.96

; Each value represents relative ratio of each gene/GAPDH when that of the control, CGHJT untreated, is set to 1.00

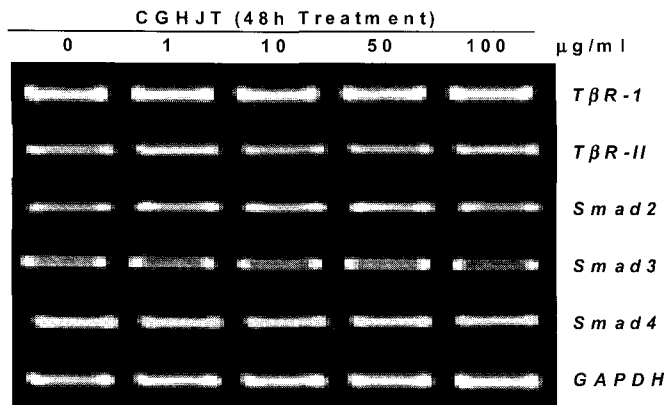


Fig. 4. Quantitative RT-PCR analysis of TGF-β1 signaling mediators in HepG2 cells treated with CGHJT

48시간 처리한 후, quantitative RT-PCR로 target gene/GAPDH 비율을 분석한 결과 약물은 TβR-I, TβR-II, Smad2, Smad3, Smad4 각각의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다(Table 4, Fig. 4).

4. 清肝解酒湯이 HepG2의 TGF-β1 target gene인 PAI-1 mRNA 발현에 미치는 영향

清肝解酒湯의 TGF-β1 생성억제에 대한 검증을 위해 TGF-β1의 target gene인 PAI-1 mRNA 발현에

1) 清肝解酒湯이 PAI-1 mRNA 발현에 미치는 영향

Table 5. Effect of CGHJT on PAI-1 mRNA Expression

	Control	CGHJT treated(μg/ml; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp.1	1.00	0.97	1.04	0.92	1.04
Exp.2	1.00	1.04	1.02	1.04	1.01

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

2) 清肝解酒湯이 TGF-β1에 의한 PAI-1 mRNA 발현촉진에 미치는 영향

Table 6. Effect of CGHJT on TGF-β1-induced PAI-1 mRNA Expression

	Control	TGF-β1 only (2 ng/ml)	TGF-β1 (2 ng/ml) + CGHJT pretreatment (μg/ml)			
			1	10	50	100
Exp.1	1.00	3.05	2.43	1.22	0.88	0.52
Exp.2	1.00	2.92	2.31	1.24	0.90	0.47

; Each value represents relative ratio of PAI-1/GAPDH when that of the control, TGF-β1 & CGHJT untreated, is set to 1.00

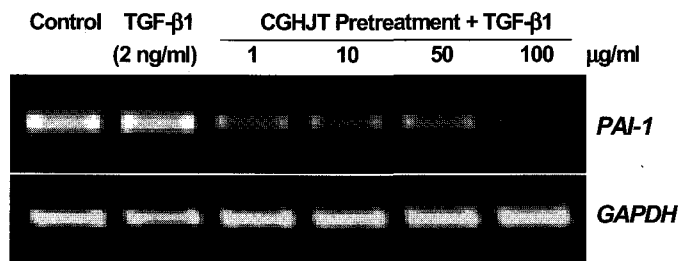


Fig. 5. Quantitative RT-PCR analysis of TGF-β1-induced PAI-1 mRNA expression in HepG2 cells treated with CGHJT

5. 淸肝解酒湯이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향

淸肝解酒湯이 T3891 fibroblast 세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 T3891 human fetal lung fibroblast를 1×10^5 cells/well 농도로 24-well multiplates에 배양하고, 淸肝解酒湯 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 TGF- β 1 투여 4시간 전에 전처리한 후, TGF- β 1 2 ng/ml을 48시간 처리하고 $1.0\mu\text{Ci/ml}$ 의

[3H]thymidine를 4시간 동안 pulse-labeling하여 DNA 내로 incorporation된 trichloroacetic acid-precipitable radioactivity의 양(CPM)을 liquid scintillation counter를 이용하여 측정된 결과, 약물의 투여가 fibroblast의 세포증식 자체에는 영향을 미치지 않았으나, TGF- β 1에 의해 유도되는 fibroblast 세포증식은 약물의 농도의존적으로 감소하였다(Table 7-8, Fig. 6-7).

1) 淸肝解酒湯이 fibroblast 세포증식에 미치는 영향

Table 7. Effect of CGHJT on T3891 Fibroblast Proliferation

	Control	CGHJT treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)			
		1	10	50	100
Exp.1	4600	4700	4650	4650	4550
Exp.2	4550	4650	4500	4600	4600
Mean	4575	4675	4575	4625	4575

; Each value (CPM; count per minute) represents incorporated radioactivity of [^3H]Thymidine

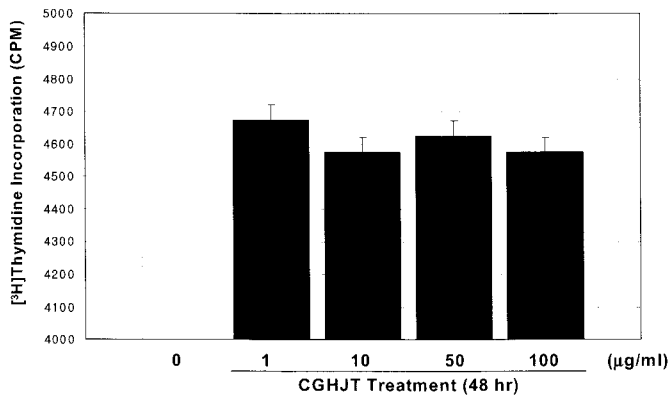


Fig. 6. CGHJT treatment showed no difference in cell proliferation of fibroblast cells

2) 淸肝解酒湯이 TGF- β 1에 의한 fibroblast 세포증식유도에 미치는 영향

Table 8. Effect of CGHJT on TGF- β 1-Induced T3891 Fibroblast Proliferation

	Control	TGF- β 1 (2 ng/ml)	TGF- β 1 (2 ng/ml) + CGHJT pretreatment ($\mu\text{g/ml}$)			
			1	10	50	100
Exp.1	4850	6550	6300	5150	4650	4450
Exp.2	4600	6450	6250	5200	4550	4100
Mean	4725	6500	6275	5175	4600	4275

; Each value(CPM) represents incorporated radioactivity of [^3H]Thymidine

6. 清肝解酒湯이 T3891 fibroblast의 CTGF, fibronectin, collagen type Iα의 mRNA 발현에 미치는 영향

TGF-β1에 의해 그 발현이 촉진되는 CTGF, fibronectin, collagen type Iα mRNA 발현에 미치는 清肝解酒湯의 영향을 알아보기 위해 T3891 human fetal lung fibroblast 1 x 10⁵ cells/well에 清肝解酒

湯 1, 10, 50, 100 μg/ml를 TGF-β1 투여 4시간 전에 전처리하고 TGF-β1 2 ng/ml를 48시간 처리한 후, quantitative RT-PCR로 target gene/GAPDH 비율을 분석한 결과, CTGF, fibronectin, collagen type Iα mRNA의 발현은 清肝解酒湯의 농도에 의존적으로 감소하였다(Table 9, Fig. 8).

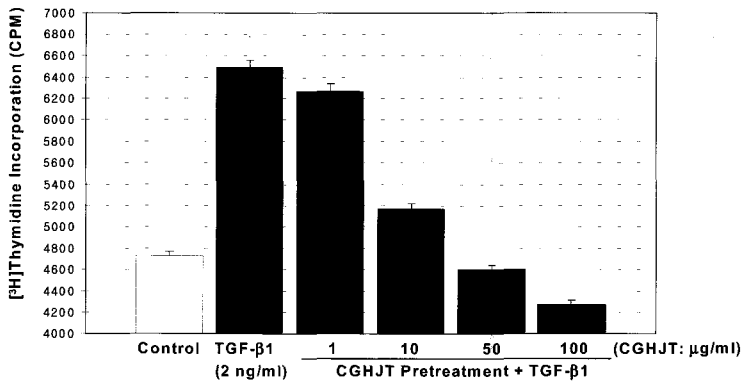


Fig. 7. CGHJT inhibited TGF-β1-induced fibroblast proliferation

Table 9. Effect of CGHJT on TGF-β1-mediated Induction of CTGF, Fibronectin, and Collagen type Iα mRNA Expression

		Control	TGF-β1 2 ng/ml	TGF-β1 (2 ng/ml) + CGHJT pretreatment (μg/ml)			
				1	10	50	100
CTGF	Exp.1	1.00	2.92	2.32	1.57	1.02	0.68
	Exp.2	1.00	2.71	2.12	1.48	1.03	0.56
fibronectin	Exp.1	1.00	2.04	1.82	1.55	1.02	0.83
	Exp.2	1.00	1.97	1.79	1.40	1.04	0.76
collagen type Iα	Exp.1	1.00	3.02	2.80	1.98	1.13	0.71
	Exp.2	1.00	2.88	2.61	2.04	1.27	0.80

; Each value represents relative ratio of each gene/GAPDH when that of the control, TGF-β1 & CGHJT untreated, is set to 1.00

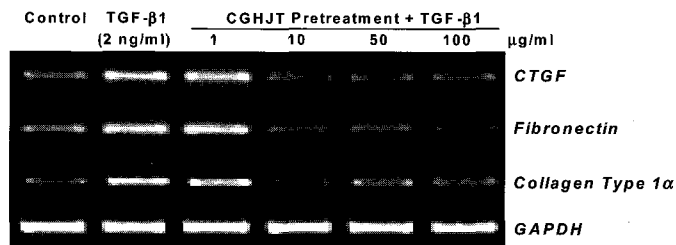


Fig. 8. Quantitative RT-PCR analysis of TGF-β1-mediated induction of CTGF, fibronectin, and collagen type Iα mRNA expression in T3891 fibroblast treated with CGHJT

V. 考 察

통계청 보고에 따르면 1992년부터 2002년까지 간 질환은 우리나라 사망원인 순위에서 5-6위를 차지해 왔고, 2002년 우리나라 30대, 40대, 50대 연령별 사망원인에서 각각 4위, 2위, 3위에 해당할 정도로¹⁶ 우리 사회에 심각한 영향을 주고 있는 질환이다.

최근 들어 우리나라는 생활양식의 서구화와 사회 문화적 변화, 그리고 나날이 증가하고 있는 개인적, 사회적 스트레스 등으로 인해 알코올 소비량이 늘어나고 있다¹. 이러한 알코올 소비의 증가는 간질환, 특히 알코올성 간질환의 발생과 밀접한 관계가 있으며, 최근 보고에서 알코올성 간경변증이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있다. 즉 1980년대에는 우리나라 간경변증의 원인으로 B형 간염바이러스가 65-80%를 차지하고, 알코올은 7%에 불과하였으나, 1990년대에는 B형 간염바이러스가 50%전후, 알코올이 30-38%를 각각 차지할 정도로 알코올에 의한 간경변증이 상대적으로 증가하였다. 이로 미루어 볼 때, 앞으로 우리나라도 구미와 같이 알코올성 간질환이 전체 간질환의 주종을 이루는 시기가 올 것으로 생각되고 있다^{2,4}.

알코올성 간질환은 급성 및 만성 알코올 섭취로 생기는 일련의 간손상을 말하며, 알코올에 의한 간손상 시 초기에 흔히 나타나는 소견은 지방간이고, 음주를 계속하면 알코올성 간염이 유발되며, 점차 간경변증으로 이행하는 것으로 알려져 있다. 음주로 인한 초기의 급성 간손상은 뛰어난 간의 재생능력 덕분에 음주를 지속하지 않는 한 쉽게 회복된다. 그러나 지속된 음주로 간손상이 반복되면 비가역적인 간경변증으로 진행되어, 결국 여러 합병증에 의하여 사망하게 된다^{6,17}.

간섬유화 과정에는 정상세포(stellate cell)가 중요한 역할을 하는데, 이들 정상세포는 대부분 휴식상태에 있다가 간세포가 손상을 받으면 염증세포 또는 혈소판에서 분비되는 사이토카인의 영향을 통해 활성화되고 증식되면서 세포외기질을 크게 증가시킨다¹⁸⁻²¹. 이때 세포외기질은 1형, 3형 콜라겐이 많은

상태로 전환된다고 알려져 있어 간섬유화를 통해 세포외기질은 양적, 그리고 질적 변화를 겪게 된다^{18,19}.

TGF- β 는 세포의 성장과 분화를 조절하는 다기능성 사이토카인으로, 그 중 TGF- β 1은 여러 가지 많은 질병의 과정 중 섬유화와 염증병변에서 잘 발현되는 것으로 보고되고 있으며, 간에서 간 정상세포를 자극하여 간섬유화에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다^{13,22}. 반복되는 조직손상과 TGF- β 조절 장애는 TGF- β 와 세포외기질의 끊임없는 생산을 유도하여 결국은 조직의 섬유화를 이끈다¹⁴.

Ligand로부터 target gene에 이르는 TGF- β 1 signaling pathway는 우선 세포막에 존재하는 receptor와 결합하는 것으로부터 시작되는데, 제1형 receptor (T β R-I), 제2형 receptor (T β R-II)가 그것이다. TGF- β 1가 receptor와 결합하면 세포질내의 Smad는 인산화되며 다른 Smad와 결합하여 신호전달에 관여한다^{23,24}. PAI-1은 핵내에 존재하며 TGF- β 1의 신호전달에 의해 최종적으로 조절을 받는 유전자의 하나로서 TGF- β 1의 작용여부를 파악할 때 지표가 되며, 세포외기질의 전환에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{24,25}.

TGF- β 1에 의해 그 발현이 촉진되는 섬유화인자로 CTGF, fibronectin, collagen type Ia 등이 있다. 섬유화 과정을 통해 세포외기질이 변화를 겪게 되면 간경변 상태에서는 정상상태의 간에서보다 몇 배 이상의 collagen과 proteoglycan 등을 함유하게 되는데 그 중 제1형 collagen이 주된 성분으로 많이 연구되어 오고 있다^{18,19,26}. CTGF는 시스테인이 풍부한 펩타이드로 TGF- β 에 의해 활성화된 섬유아세포에 의해 분비되어 collagen과 fibronectin 등 세포외기질의 합성에 중요한 역할을 담당한다. CTGF 발현을 억제하면 collagen과 fibronectin 등 세포외기질의 합성이 방해되는 것을 관찰할 수 있는데 이것으로써 CTGF가 TGF- β 가 유도하는 콜라겐 합성을 매개함을 확인할 수 있으며 이는 항 섬유화 치료 기전의 하나로도 인식되고 있다^{27,28}.

최근에는 간섬유화의 평가를 위해 hyaluronic acid, type IV collagen, type III procollagen 등 여러

가지 혈청 marker를 이용하려는 움직임이 있으며, 간섬유화 기전에 대한 이해가 높아짐에 따라 항 섬유화치료에 대한 여러 방법들이 시도되고 있다²⁰. 특히 성상세포의 활성을 억제함으로써 세포외기질의 증가를 억제하는 효과로 TGF-β1 antagonist를 활용하는 방법도 그 치료법 중의 하나가 되고 있다^{5,6,18}.

이와같이 TGF-β1은 간섬유화의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 인자로 인식되고 있으며, 한약물과 관련된 연구에서茵陳 분획물²⁹과茵陳淸肝湯³⁰이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 유의성있는 억제효과가 있음이 확인된 바 있다.

본 실험에 사용한淸肝解酒湯은對金飮子에茵陳四苓散을合方하고解酒毒의要藥인葛根, 赤楊 등을가미하여입방한방제로입상에서알코올성간질환의치료에다양하게활용되고있다.

淸肝解酒湯에 대한 연구로는, 알코올성 간손상에서 혈청학적 지표를 호전시키고 임상증상을 개선시키는 효과가 있음이 보고된 바 있으며^{7,8}, 알코올 대사관련 유전자인 ALDH 유전자 발현에는 영향을 미치지 않으나⁹, TNF-α, IL-1β 등의 사이토카인 발현을 감소시키며¹⁰, 항산화효소인 glutathione의 생성을 촉진하고¹¹, 전사(transcription)조절인자인 NFκB를 활성화시킴으로써¹² 알코올 유도성 apoptosis를 억제하고 간세포 활성을 높여 간보호작용이 있음이 확인된 바 있다.

본 실험은淸肝解酒湯이 TGF-β1이 유도하는 알코올성 간섬유화 과정에 미치는 영향을 분석하기 위하여 시행되었다. 우선淸肝解酒湯이 간세포의 TGF-β1 mRNA의 발현과 TGF-β1 단백질 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 약물의 처리농도와 처리시간에 의존적으로 간세포의 TGF-β1 mRNA 발현양이 감소되어淸肝解酒湯이 인체 간세포의 TGF-β1 유전자 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단되었다. TGF-β1 단백질 검사에서도 같은 결과를 보여 약물의 처리농도에 의존적으로 단백질 생성 억제가 관찰되었으며, 이에 따라淸肝解酒湯이 인체 간세포의 TGF-β1 생성을 억제함으로써 TGF-β1에 의해 촉진되는 것으로 알려진 간 성상세포의

증식 및 간섬유화과정을 억제하는 효과를 가지고 있을 것으로 추측된다.

淸肝解酒湯이 간세포의 TGF-β1 신호전달기전 관련유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 cell에 처리하여 TGF-β1 signaling pathway를 구성하는 주요인자들, 즉 TβR-I, TβR-II, Smad2, Smad3, Smad4 등의 mRNA의 변화를 RT-PCR법을 이용하여 살펴본 결과,淸肝解酒湯은 이들 각각의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 반면, TGF-β1의 target gene인 PAI-1 mRNA 발현에 있어서는淸肝解酒湯에 의한 직접적인 영향은 없었으나,淸肝解酒湯이 TGF-β1에 의해 증가된 PAI-1 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시킴이 관찰되었다.茵陳분획물과茵陳淸肝湯을 이용한 연구에서도 약물이 TGF-β1 receptor 및 Smad2,3,4 유전자에는 영향을 미치지 않았으나 PAI-1의 유전자 발현을 억제하는 등 본 실험과 동일한 결과를 보인 바 있다^{29,30}.淸肝解酒湯이 PAI-1의 유전자에 직접 영향을 미치지 않으나 TGF-β1에 의해 증가된 PAI-1 mRNA 발현에 영향을 미치는 점은 약물의 작용부위가 target gene임을 시사하였다.

[³H]Thymidine Incorporation Assay 결과 TGF-β1에 의해 유도되는 fibroblast 세포증식촉진에 대해淸肝解酒湯의 억제작용이 관찰되어,淸肝解酒湯이 TGF-β1 생성을 직접 억제하는 효과와는 별개로 fibroblast 세포증식 억제성분을 함유하고 있을 가능성과 또 TGF-β1에 antagonist로 작용할 가능성을 시사하였다.

淸肝解酒湯이 TGF-β1에 의해 그 발현이 촉진되는 섬유화관련 유전자 CTGF, fibronectin, collagen type Ia mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과,淸肝解酒湯이 농도 의존적으로 TGF-β1에 의해 증가되는 세 가지 유전자의 발현을 모두 억제하는 것으로 관찰되었다. 이전의茵陳분획물 실험에서는 fibronectin mRNA 발현에 대해 주목할 만한 영향이 관찰되지 않은 바 있고²⁹,茵陳淸肝湯 실험에서는 본 실험결과와 동일하게 약물에 농도 의존적으로 세

가지 유전자 모두의 발현 감소가 관찰된 바 있다³⁰. 이로써 淸肝解酒湯이 肝纖維化 기전에 있어서 fibroblast 세포증식을 억제하고 섬유화 관련유전자의 발현을 억제하는 효과가 있음을 살펴볼 수 있었다.

이상에서 淸肝解酒湯은 간세포의 TGF-β1 합성을 억제함으로써 섬유화 유발 첫단계 물질의 생성을 억제함이 확인되었으며, 섬유아세포의 증식과 섬유화유발 유전자의 발현을 억제함으로써 이차적으로 섬유화 억제작용이 있음이 관찰되었다. 따라서 淸肝解酒湯은 간조직의 섬유화를 억제하여 肝硬變症의 진행을 방지하는 효과가 있을 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 結 論

淸肝解酒湯이 HepG2 cell의 TGF-β1 유도성 섬유화에 미치는 영향을 확인하고자 TGF-β1 ELISA, [³H]Thymidine incorporation assay를 시행하고, 각 유전자의 발현을 파악하기 위하여 quantitative RT-PCR을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 淸肝解酒湯은 HepG2 cell의 TGF-β1 mRNA 발현을 약물의 처리농도와 시간에 의존적으로 억제하였다.
2. 淸肝解酒湯은 HepG2 cell의 TGF-β1 단백질 생성을 약물의 처리농도에 의존적으로 억제하였다.
3. 淸肝解酒湯은 TGF-β1의 신호전달기전 관련 유전자인 TGF-β1 receptor I, II 및 Smad2,3,4 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다.
4. 淸肝解酒湯은 TGF-β1의 target 유전자인 PAI-1 mRNA 발현에 직접적인 영향을 미치지 않았으나 TGF-β1에 의해 촉진되는 PAI-1 mRNA 발현을 농도의존적으로 억제하였다.
5. 淸肝解酒湯은 TGF-β1에 의하여 촉진되는 fibroblast 세포증식을 농도의존적으로 억제하였다.
6. 淸肝解酒湯은 TGF-β1에 의해 발현이 조절되고 간섬유화와 밀접한 관련이 있는 CTGF와

fibronectin 및 collagen type Ia mRNA의 발현을 농도의존적으로 억제하였다.

이상에서 淸肝解酒湯은 HepG2 cell의 TGF-β1 합성을 억제하고, fibroblast의 증식과 섬유화유발 유전자 발현을 억제함이 관찰되어, 임상에서 알코올성 간경변증의 예방 및 치료에 다양하게 활용될 수 있는 근거를 제시한 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 통계청. 한국의 사회지표 2003. 서울: 통계청; 2004, p.25-8.
2. 한은경, 박찬일, 이상인. 간경변증의 원인적 분류와 형태학적 특징. 대한병리학회지 1990; 24(4):412-22.
3. 한요셉, 김병호, 백일현 외. 1990년대 간경변증의 원인, 합병증, 사망원인의 변화에 관한 고찰. 대한간학회지 2000;6(3):328-39.
4. 정은미, 황성규, 박홍훈 외. 간경변증 환자에서 CTP점수와 MELD점수에 따른 사망률 분석. 대한간학회지 2003;9(2):98-106.
5. 권영오. 알코올성 간질환의 새로운 치료법과 전망. 대한간학회지 2003;9(1s):36-45.
6. 황성규. 알코올성 간질환의 일반적 치료. 대한간학회지 2003;9(1s):16-26.
7. 광미애, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올대사 및 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지 2000;21(1):68-76.
8. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지 2001;22(4):107-13.
9. 김영태, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 alcohol 대사관련 유전자 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2003;24(1):123-33.
10. 김병삼, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine 발현에 미치는 영향. 대한한의학회지 2003;24(1):190-201.

11. 윤여광, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 인체간세포의 Glutathione 생성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(1):81-91.
12. 한창우, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 kupffer cell의 NFκB 활성화 및 세포사멸에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(1):59-70.
13. 김성진. Transforming Growth Factor βs 연구의 역사와 미래. Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology News 1996;3(4):17.
14. Border W.A., Noble N.A. Mechanism of Disease. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. The New England Journal of Medicine. 1994;331(19):1286-92.
15. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998, p.58, 65, 274, 286, 310, 501, 522, 536, 566, 610, 700.
16. 통계청 편집부. 2002 사망원인통계연보. 서울: 통계청; 2003, p.26-33.
17. 이영상. 알콜과 간. 내과학의 최신지견2. 서울: 한국의학; 1998, p.143-55.
18. 권영오. 간 섬유화에서 간 정상세포의 역할. 2003년 춘계 소화기연관학회 합동세미나. Recent update in GI research. 2003:177-83.
19. 정규원. 만성간질환의 미세구조-간섬유조직증식과 간유동의 정상세포. 대한간학회지 2002;8(3):343-53.
20. Grace Guzman. On the origin of hepatic fibrosis. Arch Pathol Lab Med. 2004;128:1212-1214.
21. Friedman S.L. The cellular basis of hepatic fibrosis (Mechanisms and Treatment Strategies). The New England Journal of Medicine. 1993;328(25):1828-35.
22. Nancy S, Valentina F, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor β1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995;92:2572-6.
23. Bissell D.M, et al. Transforming Growth Factor β and the Liver. Hepatology. 2001;34(5):859-67.
24. Koichi Matsuzaki, et al. Regulatory mechanisms for transforming growth factor β as an autocrine inhibitor in human hepatocellular carcinoma: Implications for roles of Smads in its growth. Hepatology. 2000;32(2):218-27.
25. Smith T.J, et al. n-Butyrate induces plasminogen activator inhibitor type 1 messenger RNA in Cultured HepG2 cells. Hepatology. 1996;23(4):866-71.
26. Friedman S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. The Journal of Biological Chemistry. 2000;275(4):2247-50.
27. Matthew R. Duncan, Ken S. Frazier, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. The FASEB Journal. 1999;13:1774-86.
28. Hideki Yokoi, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. Am J Physiol Re nal Physiol. 2002;282:F933-42.
29. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한의학회지 2001;22(3):141-55.
30. 심재욱, 김영철, 이장훈, 우홍정.茵陳淸肝湯이 TGF-β1 매개성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한의학회지 2003;24(2):1-11.