

TAA로 유발된 간섬유화 동물모델에서 인진청간탕의 효과

박신명, 이장훈, 김영철, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effect of *Yinjinchunggan-tang*(YJCGT) on Fibrogenesis in Thioacetamide(TAA)-induced Rat Liver Tissue

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

ABSTRACT

Objective : *Yinjinchunggan-tang*(YJCGT) is reported previously as having therapeutic effects on hepatitis such as anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-viral(HBV), etc. Though this prescription is not studied on its anti-fibrogenic effect, it is still expected to have the effect in the liver. Thus, this study was performed to investigate the anti-fibrogenic effect of YJCGT on thioacetamide(TAA)-induced liver fibrosis in rats.

Method : Rat liver fibrosis was induced by intraperitoneal TAA injection(150mg/kg) 3 times a week for 5 weeks. After the YJCGT (YJCGT 1g/kg, YJCGT 2g/kg)-treatment, body weight, liver and spleen weights, liver function test, the complete blood count and the portal pressure were studied.

In addition, gene expressions of ASMA, procollagen type Ia2, MMP2, TIMP1 and TIMP2, all of which are known to be associated with liver fibrosis, were analyzed by RT-PCR. After YJCGT (YJCGT 1g/kg, YJCGT 2g/kg) treatment, percentages of collagen in TAA-induced rat liver tissue were measured by image analyzer.

Results : The body weight of the normal group increased more than that of the control and YJCGT-treated groups. The AST level of the YJCGT 1g/kg-treated group significantly decreased compared to that of the control. The ALT and the GGT levels of the YJCGT 2g/kg-treated group significantly increased compared to those of the control. In the YJCGT-treated groups, WBC, RBC and Hgb elevated by TAA injection decreased but platelet count increased. In the YJCGT 1g/kg-treated group, the portal pressure elevated by TAA injection significantly decreased. The significant decreases in the gene expressions of procollagen type Ia2, MMP2 and TIMP2 were observed in the YJCGT-treated groups. In histological findings, TAA injections caused severe liver fibrosis, but the YJCGT treatment significantly reduced the amounts of hepatic collagens.

Conclusions : These results suggest that YJCGT has beneficial effects on the treatment of patients with liver cirrhosis as well as chronic hepatitis. Further study should be done to decide the optimal concentration of the YJCGT for the treatment of liver cirrhosis.

Key words : *Yinjinchunggan-tang*(YJCGT), liver fibrosis, liver cirrhosis, thioacetamide(TAA)

1. 서론

2007년 국내 사망원인통계에 의하면 간질환은 전체 사망원인 중 8위이며, 이 중 남자는 5위, 여자는 10위를 차지하고 있다¹.

간섬유화는 원인에 관계없이 진행되는 염증에

· 교신저자: 우홍정 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120
E-mail: hjwoo@khu.ac.kr

의하여 간조직에서 나타나는 상처치유 과정의 일종이며² 세포외기질 단백질의 과도한 침착을 특징으로 하는 만성 간질환의 최종적인 병변³이다.

간경변증의 주된 기전인 섬유화 억제제에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있으나⁴⁻⁷, 현재 효과적인 치료제가 제시되고 있지 못하고 있는 실정이다.

한약제에 의한 간섬유화 억제효과에 대한 연구는 간성상세포가 주된 역할을 하는 collagen의 합성과 용해와의 관계에 대한 실험적 연구들이 활발히 진행되고 있다.

인진청간탕은茵陳四苓散에地榆, 靑皮, 蘿藦子, 覆盆子 등을 가미한 처방으로⁸, 임상연구에서 만성 B형간염 환자의 간기능개선과 HBeAg의 음전율을 높이는 효과⁹ 및, C형간염에 적용하여 Anti-HCV의 역가를 낮춤으로서 감염력을 낮추고 간세포 파괴를 억제하는데 효과¹⁰가 있어 만성간염 및 간경변증의 치료에 활용되고 있다. 또한 인진청간탕은 간세포 보호 효과⁹⁻¹⁵ 및, 섬유화 억제 효과^{13,16-18}에 대한 실험적 보고도 있었다.

이에 저자는 인진청간탕이 thioacetamide(TAA) 유도 간경변모델 흰쥐에 대해 간섬유화 억제에 미치는 영향을 관찰하고자 간기능검사, 일반혈액검사 및 문맥압 측정을 시행하였고, collagen 합성과 분해 관련 인자에 대한 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기위해 RT-PCR을 통해 섬유화 관련 유전자의 mRNA 발현량을 관찰하여 그 효과를 검증하였다. 또한 간조직의 병리조직 검사를 통해 collagen 형성에 미치는 영향과 인진청간탕의 농도별 효과를 비교검증하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료 및 동물

1) 재 료

본 실험에 사용한 약제는 대한약전 및 대한약전

외 한약규격주해¹⁹에 근거하여 경희대 부속 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며 1첩당 내용 및 용량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Yinjinchunggan-tang*(YJCGT)

Herb	Scientific Name	Volume(g)
茵 陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	50
地 榆	<i>Sanguisorbae Radix</i>	15
白 朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	12
白茯苓	<i>Hoelen</i>	12
猪 苓	<i>Polyporus</i>	12
覆盆子	<i>Rubi Laevigatae Radix</i>	12
澤 瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	8
蘿藦子	<i>Raphani Semen</i>	8
三 稜	<i>Sparganii Rhizoma</i>	6
蓬 朮	<i>Zedoariae Rhizoma</i>	6
靑 皮	<i>Aurantii Immatri Percarpium</i>	6
貢砂仁	<i>Amomi Semen</i>	6
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	12
Total		171

2) 동 물

혈청검사로부터 각종 감염이 인정되지 않고, 일반증상과 체중감소가 없는 300g 내외의 Sprague-Dawley 흰쥐 수컷((주)샘타코)을 실험에 사용하였다. 실험동물은 멸균한 polycarbonate cage에 방사선 멸균한 시판 고형사료(대한실험동물센터)와 정제한 물을 자유 공급하였으며 2주 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험을 시작하였다. 실험기간 동안 명암주기 12시간 간격, 온도 25±2°C, 습도 55%로 실험실 환경을 유지하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

(1) 약제의 추출

인진청간탕 1710g을 두차례로 나누어 환류추출기(Duksan, Korea)에 넣고, 냉각기를 부착한 상태에서 증류수를 5000ml를 가하여 2시간씩 2회 가열

추출하였다. 추출액을 filter paper로 여과 후, Rotary evaporator(RE121, Buchi社, SWISS)로 감압 농축하여 농축액을 얻었다.

(2) 동결건조

이 농축액을 동결건조기(EYELA, Japan)로 건조하여 인진청간탕 195g을 얻었다.

(3) 얻어진 동결건조 엑기스를 ml당 300mg 또는 600mg의 농도가 되도록 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 실험설계

(1) 간경변유발 및 검액투여

실험동물들을 ① 정상군(Normal diet without treatment) ② 대조군(TAA only) ③ TAA+인진청간탕 1g/kg 투여군(YJCGT 1g군), ④ TAA+인진청간탕 2g/kg 투여군(YJCGT 2g군)의 4군으로 나누고 군 당 5마리씩 배치하였다. TAA는 150mg/kg의 농도로 normal saline에 녹인 후 0.22 um syringe filter로 여과멸균하여 주 3회 5주간 복강주사하였다. 검액은 실험기간동안 주 5일간 오전 10시경 1회씩 경구투여하였다. 또한 대조군에는 주 5일간 생리식염수를 동량으로 경구투여 하였다.

3) 체중측정

5주의 실험기간동안 4군의 체중을 주 1회씩 측정하였다.

4) 간과 비장의 중량측정

5주간의 실험이 끝난 후 2일이 경과하여 동물들을 희생하여 간과 비장을 적출한 후 중량을 측정하였다.

5) 간기능검사와 CBC 검사

동물을 희생하고 혈액을 채취하여 간기능검사 및 CBC 검사를 시행하였다. 간기능검사는 Beckman Coulter, LX-20을 이용하여 수행하였으며, 검사항목으로는 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), total bilirubin, alkaline phosphatase(ALP), γ -glutamyltransferase(GGT) 등이었고, CBC 검사는 SIEMENS Hematology system ADVIA 120을 이용하여 수행하였으며, 검사항목으

로는 white blood cell(WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin(Hgb), hematocrit(Hct), platelet(PLT) 등을 선택하였다.

6) 문맥압 측정

실험동물을 마취제(zoletill)를 0.3ml/kg 농도로 근육주사하여 마취시킨 후 개복하고 문맥을 찾아 18G antio catheter(BD bioscience)를 삽입한 후 문맥압 측정장치에 연결 후 문맥압에 비례하여 상승되는 물기둥의 높이를 측정하였다.

7) 간조직 내 유전자발현 검사(RT-PCR)

(1) RNA추출

RNeasy Mini Kit(Qiagen, TX, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 즉, 동물을 희생한 후 간조직을 적당량 취하여 RNAlater solution(Qiagen, TX, USA)에 넣었다가 24시간 이상 지난 다음에 간조직을 70mg 내외로 채취하여 50ml tube에 넣고 RLT-BME buffer(Qiagen, TX, USA) 1ml를 가한 후 Tissue Miser (Fisher Scientific, CA, USA)를 이용하여 homogenize 한 후 얼음 위에서 10분간 방치하여 상층액을 얻고 이것을 Shredder column(Qiagen, TX, USA)에 통과시켜 잡질을 제거하였다. 그런 다음 RNeasy Mini Kit를 이용하여 RNA를 분리하였다.

(2) cDNA 합성

Reverse Transcription System(Promega, WI, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 즉, MgCl₂ (25mM) 4ul, 10X RT buffer 2ul, dNTP(10mM) 2ul, Random primer 1ul(0.5ug), Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor 0.5ul, AMV RT 0.6ul(15U), target RNA 1ug을 넣고 나머지는 DEPC water를 첨가하여 총 용량이 20.1ul가 되게 하여 25℃ 10분, 42℃ 1 시간, 95℃ 5분동안 처리하여 cDNA를 제작하고 5℃에서 차게 해서 -20℃에 보관하였으며 필요할 때마다 사용하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로는 GAPDH를 사용하고, target gene으로는 ASMA, Procollagen Type

Ia2, MMP2, TIMP1, TIMP2 등의 gene을 사용하여 얻으며 각 primer의 sequence는 다음과 같다.

Table 2. Oligonucleotide Primers Used for Quantitative RT-PCR Analysis(All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Sequences	PCR-cycle
rCOL1a2-F	5'- TGA GCC TGG TGA GCC CG -3'	30
rCOL1a2-R	5'- TCT CGC CAG GTC TTC CAG G -3'	30
rASMA-F	5'- GTC GGG ACC TCA CTG ACT ACC -3'	27
rASMA-R	5'- CAA AAT CCA GGG CGA CAT AAC ACA G -3'	27
rTIMP1-F	5'- GCC TAC ACC CCA GCC AT -3'	33
rTIMP1-R	5'- ATG CCA GGG AAC CAG GAA GC -3'	33
rTIMP2-F	5'- GGC AAC CCC ATC AAG AGG ATT CAA T -3'	30
rTIMP2-R	5'- CAC ACT GCT GAG GAG GGG -3'	30
rMMP2-F	5'- CCC CAA GCT CAT CGC AGA T -3'	33
rMMP2-R	5'- GGT CCA CGA CGG CAT CC- 3'	33
rGAPDH-F	5'- GGC ATC GTG GAA GGG CTC AT -3'	25
rGAPDH-R	5'- AGG GAT GAT GTT CTG GGC TGC -3'	25

(4) RT-PCR

Top DNA Polymerase Kit(Bioneer, 대전, Korea)을 사용하여 수행하였다. 10X buffer 5ul, dNTP 4ul, primers FWD, REV 각 20 pmoles, ddH₂O 35.8 ul, Taq Polymerase 0.2ul, cDNA 1ul를 넣어 총 volume이 50ul가 되게 하여 PCR을 수행하였다. 첫 번째 cycle에서는 95°C 5분, 55°C 1분, 72°C 1분으로 하였고, 이후 각 primer에 따라 23-31cycles는 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분으로 하였으며, 마지막 cycle은 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 10분으로 하였다. 이렇게 하여 생긴 산생물은 2% agarose gel을 이용하여 전기영동(110 Volt, 20분간) 한 후 I-Solution (iMTechnology, Vancouver, Canada) program을 사용하여 각 밴드의 density를 정량화 하였다.

8) 간의 병리조직학적 검사

5주간 TAA injection 및 약재투여 후 동물을 에테르 마취 하에 채혈 및 방혈치사시킨 다음 간장을 적출하여 10% 중성포르말린 용액에 고정한 후 파라핀포매 후 로타리 마이크로톰으로 4um 두께로 조직절편을 제작한 다음 Hematoxylin & Eosin

(H&E) 염색 및 Masson-Trichrome 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였고 Media Cybernetics사의 Image Pro Plus program을 이용하여 섬유화 정도를 전체 면적에 대한 비율로 표시하였다.

3. 통계처리

대조군과 인진청간탕 처리군과의 비교에는 SPSS version 14.0K를 이용하여 one-way ANOVA를 사용했고 사후검증으로는 LSD 검증을 하였으며, p<0.05인 경우를 유의성이 있는 것으로 보았다.

III. 결 과

1. 체중의 변화

정상군은 체중이 점진적으로 증가하였으나, 대조군과 YJCGT 1g군 및 YJCGT 2g군 모두 정상군에 비해 체중은 감소하였다(Fig. 1).

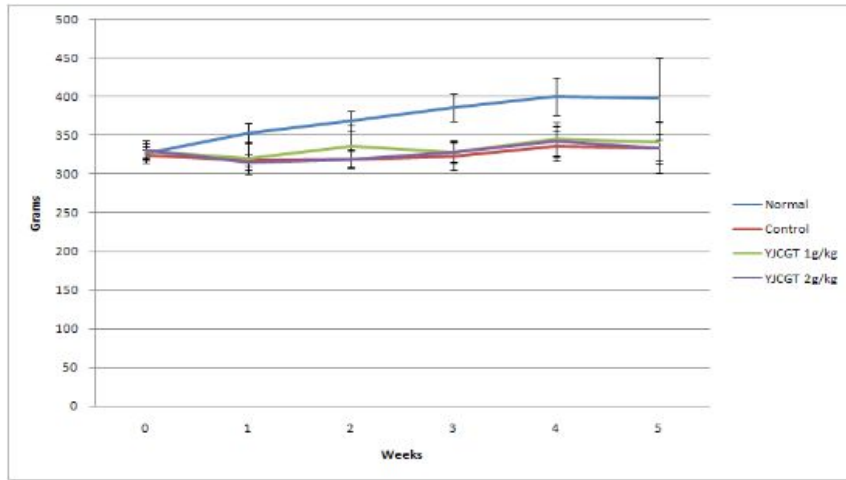


Fig. 1. Changes of the rat's body weight in four groups.

The weight of the normal group was increased more than that of the control and the YJCGT-treated groups.

2. 간과 비장의 중량 측정

간의 중량은 정상군에서 14.2g, 대조군에서 17.7g, YJCGT 1g군에서 19.2g, YJCGT 2g군에서 19.0g 이었다. YJCGT 1g군과 YJCGT 2g군에서 대조군에 비하여 증가하는 경향이 있으나 통계적 유의성은 없었다. 비장의 중량은 정상군에서 0.8g, 대조군에서 0.9g이었고, YJCGT 1g군에서 1.1g, YJCGT 2g군에서 1.1g 이었다. 대조군에 비하여 YJCGT 1g군과 YJCGT 2g군에서 증가하는 경향이 있으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

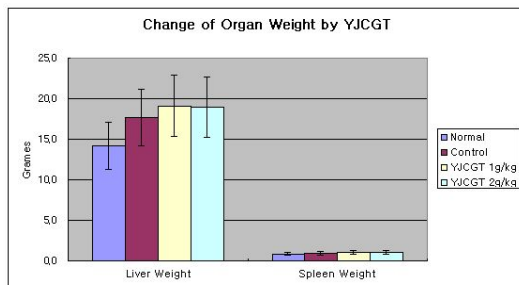


Fig. 2. Change of the organ weight after YJCGT treatment.

The weights of liver and spleen of YJCGT

-treated groups were slightly increased compared to those of the control group. But there were no significant differences, statistically.

3. 간기능검사 소견

YJCGT 1g군은 대조군에 비하여 AST치는 유의하게 감소하였고($p < 0.01$), ALT, Alp 및 GGT는 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. YJCGT 2g군은 대조군에 비하여 AST치는 감소하는 경향을 보였으며, ALT와 GGT는 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), Alp는 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

4. CBC 검사 소견

YJCGT 1g은 대조군에 비하여 WBC, RBC 및 Hgb은 수치가 감소하는 경향을 보였고, Hct와 PLT는 증가하는 경향을 보였다. YJCGT 2g은 대조군에 비하여 WBC, RBC, Hgb 및 Hct은 수치가 감소하는 경향을 보였고, PLT는 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4).

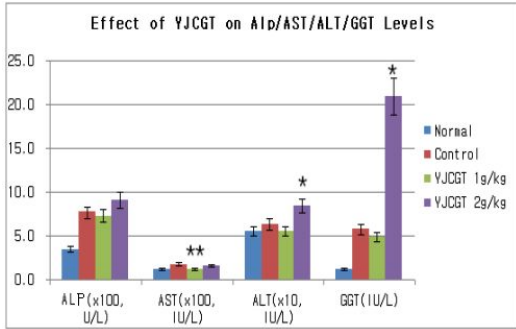


Fig. 3. Effect of YJCGT on AST/ALT/Alp/GGT levels.

TAA caused marked AST/ALT levels elevations compared to the normal group. The AST level of YJCGT 1g/kg-treated group was significantly decreased compared to that of the control group. The ALT and the GGT levels of the YJCGT 2g/kg-treated group were significantly increased compared to those of the control group(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

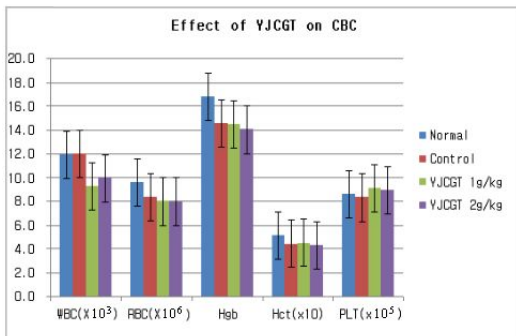


Fig. 4. Effect of YJCGT on the complete blood count(CBC).

In the YJCGT-treated groups, WBC, RBC and Hgb elevated by TAA injection were decreased but platelet was increased. But there were no significant differences, statistically.

5. 문맥압 측정

YJCGT 1g군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 문맥압이 하강하였다($p < 0.01$). YJCGT 2g군에서는 대조군에 비해 유의한 하강은 없었다(Fig. 5).

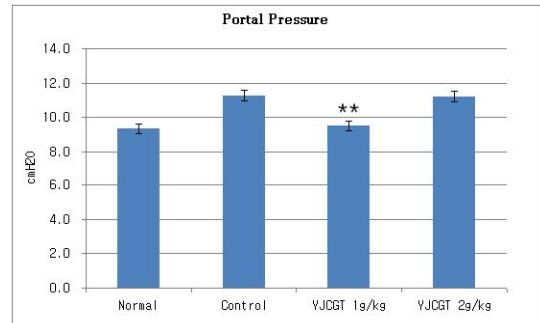


Fig. 5. Change of portal pressure after YJCGT treatment.

In the YJCGT 1g/kg-treated group, the portal pressure elevated by TAA injection was significantly decreased(** : $p < 0.01$).

6. RT-PCR

YJCGT 1g군은 대조군에 비하여 ASMA mRNA 발현량은 증가하는 경향을 보였고, Procollagen Type Ia2($p < 0.05$), MMP2($p < 0.01$) 및 TIMP2 mRNA ($p < 0.05$) 발현량은 유의하게 감소하였으며, TIMP1 mRNA 발현량은 감소하는 경향을 보였다. YJCGT 2g군은 대조군에 비하여 ASMA mRNA 발현량은 증가하는 경향을 보였고, Procollagen Type Ia2 ($p < 0.05$), MMP2($p < 0.05$) 및 TIMP2 mRNA ($p < 0.05$) 발현량은 유의하게 감소하였으며, TIMP1 mRNA 발현량은 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6-10).

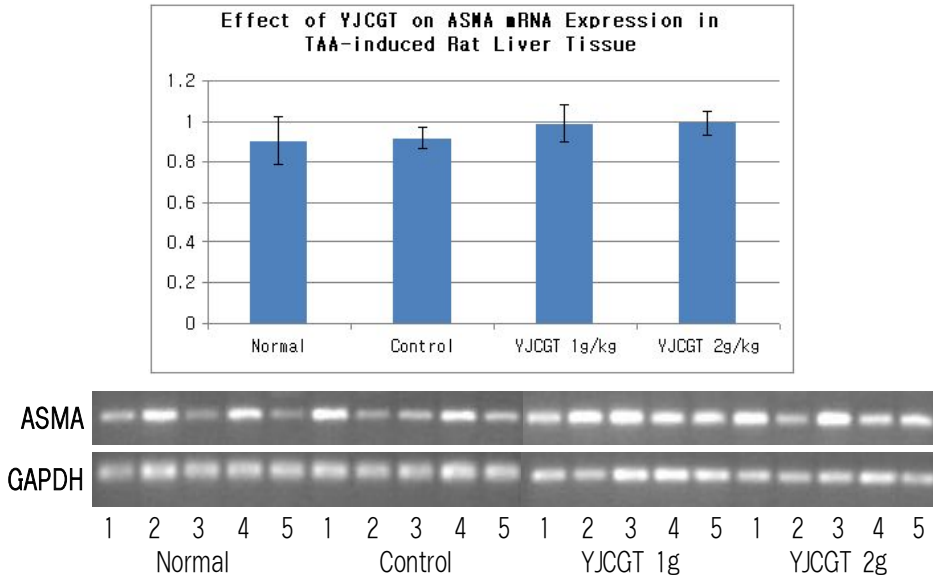


Fig. 6. ASMA/GAPDH expression <quantitative RT-PCR>.

ASMA mRNA expressions of YJCGT-treated groups were increased compared to those of the control group. But there were no significant differences, statistically.

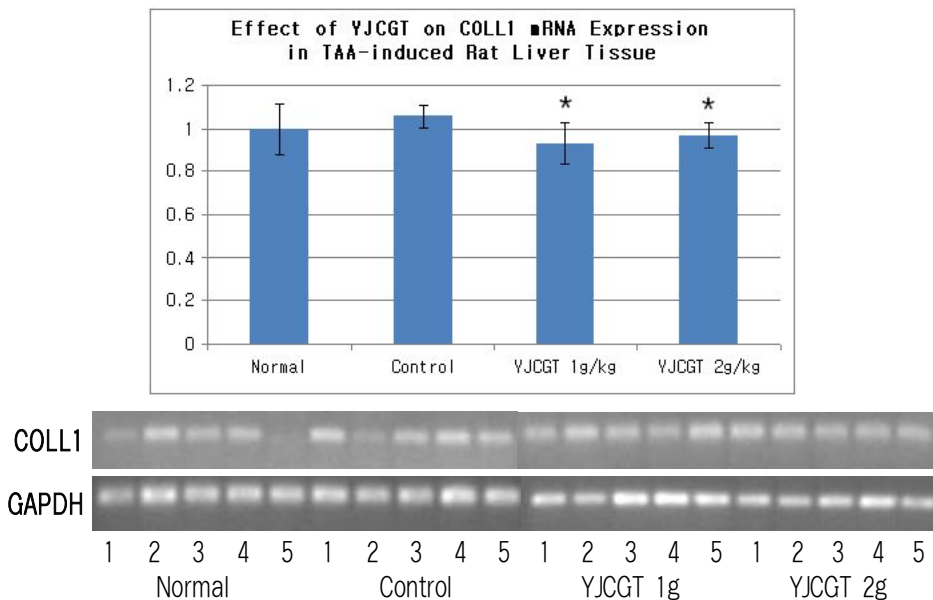


Fig. 7. COLL1/GAPDH expression <quantitative RT-PCR>.

Procollagen Type Ia2 mRNA expressions of the YJCGT-treated groups were significantly decreased compared to those of the control group(*; $p < 0.05$).

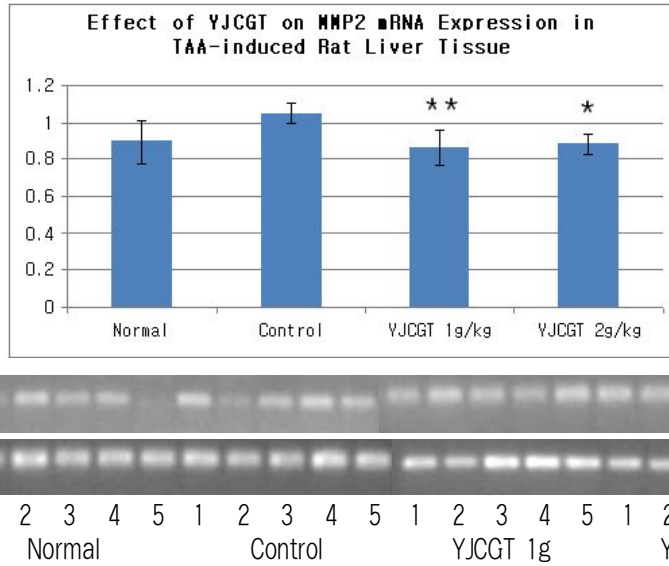


Fig. 8. MMP2/GAPDH expression <quantitative RT-PCR>.

MMP2 mRNA expressions of the YJCGT-treated group were significantly decreased compared to those of the control group(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

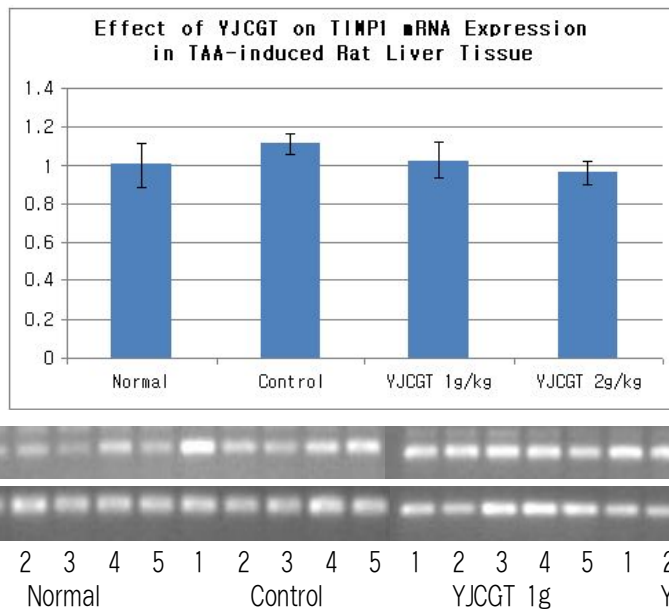


Fig. 9. TIMP1/GAPDH expression <quantitative RT-PCR>.

TIMP1 mRNA expressions of the YJCGT-treated groups were decreased compared to those of the control group. But there were no significant differences, statistically.

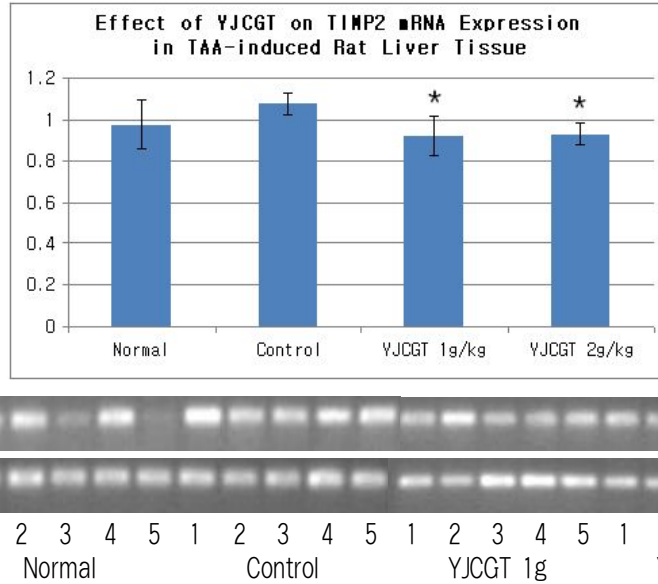


Fig. 10. TIMP2/GAPDH expression <quantitative RT-PCR>.

TIMP2 mRNA expressions of the YJCGT-treated group were significantly decreased compared to those of the control group(*: $p < 0.05$).

7. 간의 병리조직학적 소견

1) Hematoxylin & Eosin 염색

정상군에서는 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었고, 문맥역 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포 괴사나 염증반응은 관찰되지 않았다(Fig. 11-a). 대조군에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 문맥역과 중심정맥 주위로 심한 정도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 심한 간세포 괴사와

이에 동반된 염증반응도 관찰되었다(Fig. 11-b). YJCGT 1g군에서는 중등도의 간소엽의 입체구조가 부분적으로 소실되었고 문맥역, 중심정맥부분 및 기타 간조직에서 중등도의 섬유화가 관찰되었다(Fig. 11-c). YJCGT 2g군에서는 병리조직 소견이 대조군보다는 경미하였으나, YJCGT 1g군에 비하여 간세포 괴사와 염증이 심하게 나타났다(Fig. 11-d).

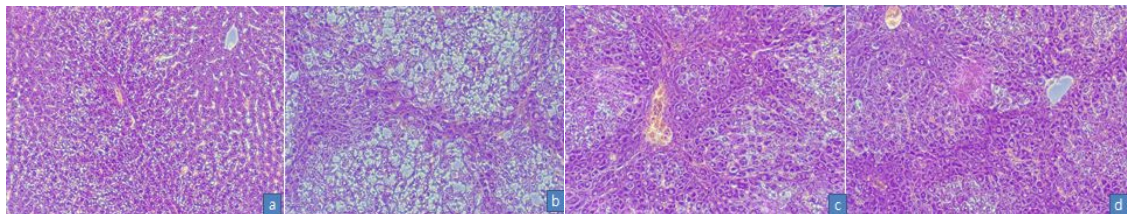


Fig. 11. Histological findings of TAA induced liver damages in SD rats(H&E stain, x200).

a) Normal. b) Control : TAA injection only, c) TAA injection + YJCGT 1g/kg and d) TAA injection + YJCGT 2g/kg.

2) Masson-Trichrome 염색

정상군에서는 문맥역에만 소량의 collagen 침착이 관찰되었다(Fig. 12-a). 대조군에서는 문맥역 및 중심정맥 주위로 현저한 collagen 침착이 관찰되었다(Fig. 12-b). YJCGT 1g군에서는 문맥역과 중심정맥 주위로 collagen의 침착이 대조군에 비하여

감소하였다(Fig. 12-c). YJCGT 2g군에서는 YJCGT 1g군에 비하여 collagen 침착이 더 심했다(Fig. 12-d). 간조직 면적 중 collagen이 차지하는 면적의 비율을 측정하여 percentage로 표시하였다. YJCGT 1g군과 YJCGT 2g군은 대조군에 비하여 collagen의 양이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 13).

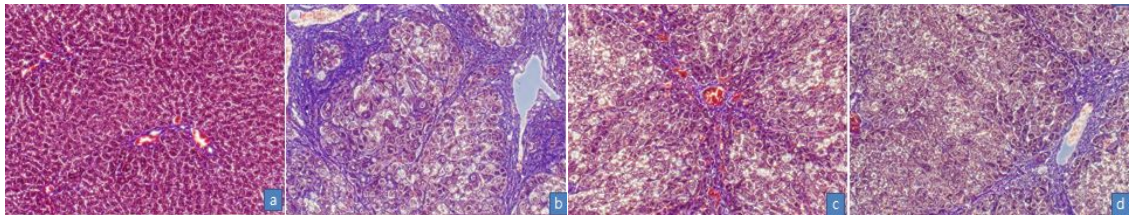


Fig. 12. Histological findings of TAA induced liver damages in SD rats(Masson-Trichrome stain, x200).

Collagen fibers are stained in blue color. a) Normal, b) Control : TAA injection only, c) TAA injection + YJCGT 1g/kg and d)TAA injection + YJCGT 2g/kg.

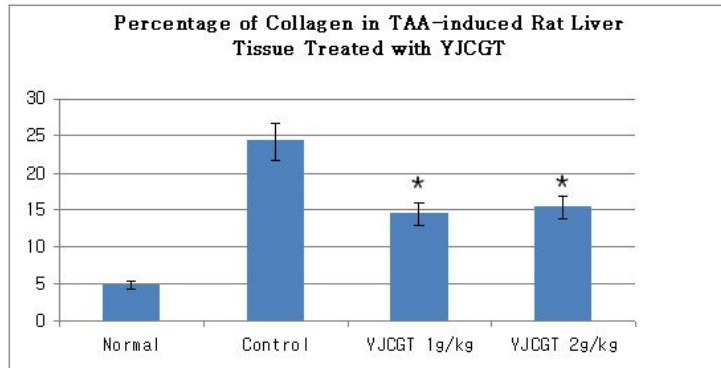


Fig. 13. Percentage of collagen in TAA-induced rat liver tissue treated with YJCGT.

YJCGT treatment significantly reduced the amounts of hepatic collagens(*: $p < 0.05$).

IV. 고찰

통계청에서 발표한 2007년 국내 사망원인통계에 의하면 간질환은 전체 사망원인 중 8위이며, 남자의 사망원인은 5위, 여자의 사망원인은 10위를 차지하고 있다. 특히 40대와 50대에서는 간질환이 3대 사망원인중 하나를 차지하고 있다¹.

간경변증의 대표적인 원인은 알코올의 과다섭취와 B형 및 C형 간염 바이러스에 의한 만성적인 감염이다. 국내 간경변증 환자에서는 63-73%가 HBsAg 양성으로 B형 간염이 가장 흔한 원인이다²⁰. 최근에는 시간이 경과함에 따라 HBsAg 양성률은 점차 감소하고 있는 양상이나²¹, 여전히 한국은 HBsAg 양성률이 약 5% 이하로²² B형 간염 호발국

이다. 다음으로는 20%가 C형 간염에 기인한 간경변증으로 최근 증가하는 추세다²⁰. 결국 원인이 무엇이든지 진행되는 염증에 의하여 간섬유화가 진행되고, 계속되는 간섬유화의 과정을 거쳐 간경변증을 유발하므로 간경변증 치료에 있어서 간섬유화와 관련된 연구의 중요성과 효과적인 치료대책이 더욱 강조되고 있다.

간섬유화는 간조직에서 나타나는 상처치유 과정의 일종이며² 세포외기질 단백질의 과도한 침착을 특징으로 하는 만성 간질환의 최종적인 병변³으로 여러 원인에 의하여 간에 염증이 유발되고 그때 분비된 cytokine이 간성상세포를 증식 및 활성화시키고²³⁻²⁴, 활성화된 간성상세포는 collagen을 합성하여 세포외기질내에 축적시켜 간섬유화가 이루어진다²⁵.

간섬유화는 간경변과는 달리 가역적이고 thin fibril로 구성되며, 결절형성이 없는 것으로 알려져 있고 간손상의 원인이 소실되면 정상회복이 가능할 수 있으나, 이러한 간섬유화 과정이 반복적으로 지속되면 세포외기질간의 교환결합이 증가하여 thick fibril을 형성하고 결절이 있는 비가역적인 간경변으로 진행된다²⁶.

즉, 간섬유화의 기전을 이해하는데 있어서 간성상세포와 세포외기질 특히 collagen과의 관계가 매우 중요하다.

간을 구성하는 4가지 세포 즉 간세포, 혈관상피세포, Kuffer 세포 및 간성상세포 중 간성상세포가 간섬유화에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁷.

간성상세포는 Disse 강(space of Disse) 내에 존재하며 간세포 및 내피세포와 밀접하게 접해 있으며, 간 전체세포의 약 5-8%를 차지하고 있다²⁸. 간성상세포의 가장 중요한 구조적 특징은 세포질 내 지방과립으로 이는 주로 retinyl ester로 이루어져 있어 간성상세포가 retinoids의 주 저장장소이자 이의 대사에 관여한다는 것을 시사하고 있다²⁹.

정상 간에서는 간세포, 동모양혈관 내피세포

(endothelial cell) 및 간성상세포에서 세포외기질이 생성되지만, 간손상을 받은 후에는 주로 활성화된 간성상세포에서 세포외기질이 생성되고 있다. 손상 받은 간세포나 쿠퍼세포 등에서 분비된 각종 cytokine이나 oxidative stress등에 의해 간성상세포가 활성화된다. 활성화된 간성상세포는 각종 성장인자에 대한 반응이 증가하고, 근섬유모세포(myofibroblast) 유사형태의 세포로 변화하여 다량의 collagen을 합성하고 있다. Type I collagen은 간성상세포를 더욱 활성화시키고 있다. 여러 가지 cytokine 중 transforming growth factor- β (TGF- β), platelet derived growth factor(PDGF) 등이 간성상세포 활성화의 가장 중요한 인자로 작용하고 있다³⁰⁻³².

간조직에서 발견되는 세포외기질에는 교원질, 당단백질(glycoprotein), pro-teoglycan, glycosaminoglycan 등이 있다³³. Collagen은 glycine-proline-hydroxyproline을 지닌 단백질로서 제 1형부터 제 19형까지 여러 종류가 있으나 Type I, III, IV, V, VI collagen이 간과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 원섬유를 형성하는 교원질(fibril-forming collagen)은 Type I, III, V, VI collagen이며, Type IV collagen은 sheet를 형성하는 교원질(sheet-forming collagen)로서 주로 기저막을 구성하고 있다³⁴.

Collagen은 주로 활성화된 간성상세포에서 생성되며 collagen의 증가는 간섬유화의 중요 원인이 되고 있다. 간경변증 환자의 간조직 내에서는 collagen 총량이 정상 때보다 약 10배 이상 증가되어 있다³⁵⁻³⁶. 특히 간섬유화에서는 type I, III, IV collagen이 증가한다³⁷.

상기의 간섬유화의 기전을 토대로 간섬유화 치료는 다음 몇 가지 방법으로 간추릴 수 있다. 첫째는 섬유화를 막기 위한 가장 효과적인 방법으로는 손상 원인을 제거하는 것이고, 둘째는 간의 염증을 억제하는 것이고, 셋째는 간성상세포의 활성화를 억제시키는 것이고, 넷째는 세포외기질의 분해를 촉진시키는 것이다³⁸.

기존의 한약제에 의한 간섬유화 억제효과에 대한 연구로는 염증반응을 차단하는 효과에 대한 검증과 섬유화 과정에서 가장 중요한 역할을 하는 간성상세포와 섬유화 관련 매개물질에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

인진청간탕은 茵陳四苓散에 地榆, 靑皮, 蘿藦子, 覆盆子 등을 가미한 처방으로⁸ 만성 B형간염 환자의 간기능개선 효과와 HBeAg의 음전율을 높이는 효과⁹, C형간염에 적용하여 Anti-HCV의 역가를 낮춤으로서 감염력을 낮추고 간세포 파괴를 억제하는데 효과¹⁰, 실험동물의 전격성간염에서 생존율을 높이는 효과¹¹가 있으며 장기 투여시에도 안정성이 입증된다는 보고가 있었다¹².

인진청간탕 및 한약제와 관련된 실험적 간섬유화 및 간경변에 관한 연구로 인진청간탕이 간기능 손상의 회복 및 간섬유화로의 진행억제효과 등이 있음이 보고된 바 있다^{13,16}.

분자생물학적 연구에서는 인진청간탕 및 인진의 분획물들이 각종 간세포손상관련 유전자의 발현을 조절하며 세포사멸을 억제하여 간세포를 손상으로부터 보호하고¹⁴⁻¹⁵, 또한 인진이 TGF- β 1 합성을 억제하였으며 fibroblast의 세포증식과 섬유화 유발 유전자의 발현을 억제하는 효과가 있었다³⁹.

최근에는 인진청간탕에 대한 collagen의 합성과 용해와 관련된 실험적 연구들이 진행되고 있는데 비실질세포의 procollagen 합성 억제에 대한 효과¹⁷와 dimethylnitrosamine(DMN) 유발 간섬유화와 단백질 산화를 억제시키는 효과¹⁸가 보고되었으며, 또한 인진이 간성상세포의 활성화와 증식을 억제하는 효과⁴⁰가 있다고 보고되었다.

기타 한약제의 간경변증 및 간섬유화 억제와 관련하여서도 다양한 실험적 보고가 있어왔다. 육울탕 및 산울탕이 DMN 및 담도결찰로 유발된 간경변증에 미치는 효과⁴¹ 및 청간해주탕이 TGF- β 1 합성을 억제하며 fibroblast의 세포증식과 섬유화 유발 유전자의 발현을 억제하는 효과⁴²와 알코올 유발 간섬유화와 단백질 산화를 억제시키는 효과⁴³가 보

고되었으며, 단삼이 간성상세포의 활성화와 증식을 억제하는 효과⁴⁴가 보고되었다.

간경변의 동물모델은 간경변과 관련된 치료 및 기전의 연구에 있어서 매우 중요하다. 그 이유는 동물모델을 통해서 연속적인 간조직 획득이 가능하며 윤리적인 이유로 사람에서 직접할 수 없는 실험이 가능하기 때문이다. 간섬유화 동물모델은 간섬유화를 유발하는 방법에 따라 크게 간독성물질, 면역학적 손상⁴⁵, 담도결찰⁴⁶, 알코올성⁴⁷ 등이 있다. 간독성 물질은 주로 CCl₄⁴⁸, DMN⁴⁹ 및 TAA⁵⁰를 이용하는 방법들이 있다.

이중 TAA는 활성화 산소종을 매개로 하여 간손상을 유도하며, 이로 인한 랫드의 간경변 모델은 사람의 경우와 형태학적, 생화학적 특징이 유사하여 재시행시 동일한 병변을 얻을 수 있으며 사망률이 낮은 것으로 보고되고 있으며⁵¹⁻⁵², 특히 TAA 모델은 CCl₄ 모델보다 재생 결절과 간섬유화가 더 뚜렷하고 조직 소견이 사람 간경변증과 더 유사하다고 평가된다⁵³.

이제까지 흰쥐를 대상으로 한 인진청간탕의 간섬유화 연구는 CCl₄¹³, DMN¹⁸으로 유발된 간경변 모델을 대상으로 하였으나, 본 연구는 TAA로 유발된 흰쥐 모델을 통해 인진청간탕의 간섬유화 억제 효과를 검증하였다.

본 연구에서는 TAA로 유발 동물실험에서 정상군, 대조군(TAA 단독투여), TAA+인진청간탕 1g/kg 투여군(YJCGT 1g군), TAA+인진청간탕 2g/kg 투여군(YJCGT 2g군)으로 나누어 인진청간탕의 간기능개선 및 간보호에 미치는 영향을 살펴 보았다. 항목으로는 간의 무게, 간기능검사, 일반혈액검사, 문맥압 측정을 채택하였다. 또한 인진청간탕의 농도 차이를 두고 각 항목을 비교관찰 하였다.

정상군은 체중이 점진적으로 증가하였으나, 대조군과 인진청간탕 처리군 모두 정상군에 비해 체중은 감소하였다. 간과 비장의 중량은 인진청간탕 처리군에서 대조군에 비하여 증가하는 경향이 있

으나 통계적 유의성은 없었다.

간기능검사 결과 YJCGT 1g군은 대조군에 비하여 AST치는 유의하게 감소하였고($p < 0.01$), ALT, Alp 및 GGT는 감소하는 경향을 보였다. YJCGT 2g군은 대조군에 비하여 AST치는 감소하는 경향을 보였으며, ALT와 GGT는 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), Alp는 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

CBC 검사 결과 YJCGT 1g군과 YJCGT 2g군에서 WBC, RBC 및 Hgb은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였고, PLT는 증가하는 경향을 보였으며, Hct는 YJCGT 1g군에서는 증가하는 경향을, YJCGT 2g군에서는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

문맥압 측정결과 YJCGT 1g군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 문맥압이 하강하였으나($p < 0.01$), YJCGT 2g군에서는 대조군에 비해 유의한 하강은 없었다(Fig. 5).

Alpha-smooth muscle actin(ASMA)은 간성상세포의 활성을 반영하는 지표로 삼고 있으며 휴식기의 정상세포를 평활근 actin에 대한 항체로 염색하면 세포주위와 가느다란 세포질 돌기에 면역염색이 발현되고, 이때 다른 유동세포와 간세포 등은 ASMA에 음성이 된다. 그러나 간섬유화가 진행되면 피사부위의 모든 정상세포는 증창되고 ASMA에 강한 양성을 보이게 된다⁵⁴.

Procollagen type I $\alpha 2$ 는 손상받은 간세포나 쿠퍼세포 등에서 분비된 TGF- β , PDGF와 같은 cytokine에 의해서 기저막이 손상되면서 정상세포가 활성화되면 그 결과 증가하게 된다⁵⁵.

섬유화 과정은 상처 치유를 위한 과정이다. 일반적으로 간손상을 주는 원인인자가 일시적인 경우 상처 치유를 위해 활성화된 간성상세포가 apoptosis 과정을 거치게 되고 matrix metalloproteinase (MMP)에 의해서 증가된 세포외기질이 분해되어 손상을 받기 전의 정상 간으로 환원된다⁵⁶. 인체 내에서 세포외기질이 과량 생성되면 곧바로 세포외기

질의 단백질분해효소에 의한 분해과정(fibrolysis)으로 이어지고 있다. MMPs가 중요한 단백질분해효소로 작용하고 있으며 인체의 간에서는 MMP-1, -2, -3, -8, -9, -12, -13, -14의 여러 종류가 생성되고 있다⁵⁷. MMP2는 주로 기저막을 형성하고 있는 collagen과 변성된 collagen을 분해하고, MMP8은 원섬유(fibril)를 형성하는 collagen 중 주로 Type I과 III형 collagen을 분해하고 있다⁵⁸.

그런데 섬유화 과정에서 활성화된 간성상세포는 세포외기질 분해뿐만 아니라 세포외기질 분해를 억제하는 단백질(tissue inhibitors of MMPs, TIMP)을 동시에 분비하는 기능을 지닌다. 즉 활성화된 정상세포는 stromelysin /MMP3 및 MMP2의 주 생산원으로서 섬유화된 간의 세포외기질을 분해하지만⁵⁹, 동시에 TIMP1, 2를 활성화시켜 상기의 MMP들을 억제하고 세포외기질을 축적시켜 섬유화를 더 조장한다⁶⁰.

최근 간섬유화와 관련하여 MMPs와 TIMPs에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, 본 연구에서도 인진청간당이 TAA 유발 간경변동물 모델에서 간 섬유화 관련 유전인자인 ASMA, Procollagen Type Ia2, MMP2, TIMP1, TIMP2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 RT-PCR을 이용하였다.

YJCGT 1g군은 대조군에 비하여 ASMA mRNA 발현량은 증가하는 경향을 보였고, Procollagen Type Ia2($p < 0.05$), MMP2($p < 0.01$) 및 TIMP2 mRNA ($p < 0.05$) 발현량은 유의하게 감소하였으며, TIMP1 mRNA 발현량은 감소하는 경향을 보였다.

YJCGT 2g군은 대조군에 비하여 ASMA mRNA 발현량은 증가하는 경향을 보였고, Procollagen Type Ia2($p < 0.05$), MMP2($p < 0.05$) 및 TIMP2 mRNA ($p < 0.05$) 발현량은 유의하게 감소하였으며, TIMP1 mRNA 발현량은 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6-10).

간경변증을 유발한 흰쥐에 대하여 Hematoxylin & Eosin 염색하여 간조직을 관찰한 결과, 대조군

에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 심한 정도의 섬유화 및 광범위한 심한 간세포 괴사와 염증반응이 관찰되었다(Fig. 11-b). YJCGT 1g군에서는 중등도의 간소엽의 입체구조가 부분적으로 소실되었고 중등도의 섬유화가 관찰되었으며(Fig. 11-c), YJCGT 2g군에서는 병리조직 소견이 대조군보다는 경미하였으나, YJCGT 1g군에 비하여 간세포 괴사와 염증이 더 심하게 나타났다(Fig. 11-d).

또한 Masson-Trichrom 염색하여 간조직을 관찰한 결과 대조군에서는 문맥역 및 중심정맥 주위로 현저한 collagen 침착이 관찰되었으며(Fig. 12-b), YJCGT 1g군에서는 문맥역과 중심정맥 주위로 collagen의 침착이 대조군에 비하여 감소하였으나(Fig. 12-c), YJCGT 2g군에서는 YJCGT 1g군에 비하여 collagen 침착이 더 심했다(Fig. 12-d).

간조직 면적 중 collagen이 차지하는 면적의 비율을 측정하여 percentage로 표시한 결과 YJCGT 1g군과 YJCGT 2g군은 대조군에 비하여 collagen의 양이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 13).

이상의 결과에서 인진청간탕은 TAA 유발 간경변 동물모델에서 간기능검사 수치의 호전을 통해 간기능개선과 간보호 효과를 보였으나, 농도가 높은 경우 오히려 간기능을 악화시키는 결과를 관찰할 수 있었다. 또한 간경변시 상승하는 문맥압을 하강시키는 효과를 관찰할 수 있었다. 간섬유화와 관련된 유전인자인 Procollagen Type Ia2 mRNA 발현량을 감소시킴으로써 간성상세포의 활성억제 및 TIMP2 mRNA 발현량을 감소시킴으로써 세포외기질의 분해를 촉진시키는 효과를 나타내었다. 또한 MMP2 mRNA 발현량을 감소시킴으로써 정상 collagen 분해작용을 억제시켜 간조직을 유지시키는 효과를 관찰할 수 있었다. 간조직 검사에서는 인진청간탕이 collagen 형성을 억제하는 효과를 나타내었다. 상기의 결과들에서 공통적으로 YJCGT 1g군은 YJCGT 2g군에 비하여 간섬유화 억제효과가 우수한 것으로 관찰되었다. 따라서 간경변증의

임상 치료에 있어서 인진청간탕의 적정 농도 확정을 위한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

인진청간탕이 간섬유화 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 흰쥐에 TAA 유도 간섬유화를 유발하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상군은 체중이 점진적으로 증가하였으나, 대조군과 YJCGT 1g군 및 YJCGT 2g군 모두 정상군에 비해 체중은 감소하였다. 간과 비장의 중량은 YJCGT 1g군과 YJCGT 2g군에서 대조군에 비하여 증가하는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다.
2. 간기능검사 결과 YJCGT 1g군은 대조군에 비하여 AST치는 유의하게 감소하였고($p < 0.01$), ALT, Alp 및 GGT는 감소하는 경향을 보였다. YJCGT 2g군은 대조군에 비하여 AST치는 감소하는 경향을 보였으나, ALT와 GGT는 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), Alp는 증가하는 경향을 보였다.
3. CBC 검사 결과 YJCGT 1g군과 YJCGT 2g군에서 WBC, RBC 및 Hgb는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였고, PLT는 증가하는 경향을 보였으며, Hct는 YJCGT 1g군에서는 증가하는 경향을, YJCGT 2g군에서는 감소하는 경향을 보였다.
4. 문맥압 측정결과 YJCGT 1g군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 문맥압이 하강하였으나($p < 0.01$), YJCGT 2g군에서는 대조군에 비해 유의한 하강은 없었다.
5. RT-PCR을 통한 섬유화 관련 유전인자의 mRNA 발현량 조사 결과 인진청간탕 처리군이 대조군에 비하여 ASMA mRNA 발현량은 증가하는 경향을 나타내었고, Procollagen type Ia2, MMP2 및 TIMP2 mRNA 발현량은 유의하게 감소하였으며, TIMP1 mRNA 발현량은 감소하는 경향

을 나타내었다.

- 간조직 병리검사에서 인진청간당 처리군이 대조군에 비하여 간조직 중 collagen의 축적을 유의성있게 억제하였다.

이상의 실험결과에서 인진청간당은 간섬유화 억제 및 간세포보호 효과가 있는 것으로 판단되었다. 그러나 본 병태모델에서는 인진청간당의 고농도 투여군에서는 효과가 감소하여 향후 간경변증 및 간섬유화 치료에 있어서 인진청간당의 적정용량 수립에 대한 추가 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

- 통계청. 2007 사망 및 사망원인통계결과.
- Bissel DM, Maheer JJ. Hepatic fibrosis and cirrhosis. In: Zakim D, Boyer TD, ed Hepatology: A textbook of liver disease. Philadelphia: WB Saunders: 1998, p. 506-25.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. Clin Chim Acta. 2007;381(2):107-13.
- Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. J Hepatol. 2003;s38-s53.
- Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ et al. Ralaxin inhibits effective deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. Gut. 2001;49(4):577-8.
- 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 Hepatol. 2001;34:386-94.
- Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K et al. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. Am J Physiol. 2005;288(5):907-13.
- 경희대학교 부속한방병원. 경희한방처방집. 서울: 트윈기획; 1997, p. 244.
- 우홍정. 만성B형간염에 대한 인진청간당의 효과. 제2회 한중 학술대회 참가 논문집(간장병). 1995:18-53.
- 강우성. HCV 환자에서 인진청간당가미방투여 후 Anti-HCV역가의 변화관찰 15예. 전국 한의학 학술대회 논문집. 1998:85-6.
- 김진주. 인진청간당이 MHV-2로 유발된 마우스의 손상간에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1996.
- 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당의 안전성에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1997;20(1):57-89.
- 승현식, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당이 간보호 및 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):21-32.
- 박용진, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당가미방이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(1):145-64.
- 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 인진청간당가미방이 간세포활성세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19(2):337-72.
- 강경태, 이장훈, 우홍정. 인진청간당가미방이 실험적 흰쥐의 간경변증에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1997;20(2):133-50.
- 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당이 흰쥐의 간장 비실질세포의 procollagen 합성 억제에 미치는 효과에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2003;24(4):817-25.
- 박상백, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당이 DMN 유발 간섬유화와 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):200-18.

19. 지형준 외. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인덱스사; 1998, p. 58-700.
20. 김정룡. 소화기계질환. 서울: 일조각; 2005, p. 662-72.
21. 주광로, 방성조, 송병철 등. 1990년대 후반 한국 성인의 B형 간염 바이러스 표지자 보유양상: 건강검진 수검자 70,347명의 성적조사. 대한소화기학회지. 1999;33:642-52.
22. 권오상, 이창홍. 국내 만성 B형 간염 환자 자너들의 HBV 감염율의 변화. 대한간학회지. 2001;7(3s):160-2.
23. Gressner AM. Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops and extracellular matrix molecules. Zeitschrift fur Gastroenterologic. 1992;30(s):5-16.
24. Li D, Freidman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. Journal of Gastroenterology & Hepatology. 1999;14(7):618-33.
25. Niemelä O. Collagen breakdown products as markers of fibrosis and cirrhosis. Alcohol & Alcoholism Supplement. 1994;2:345-52.
26. 이관식. 간섬유화 기전. 대한간학회 제3차 Postgraduate Course. 2005:9-19.
27. Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. Journal of Gastroenterology. 1997;32(3):424-30.
28. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. J Cell Biol. 1977;72:441-55.
29. Blomhoff R, Wake K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. FASEB J. 1991;5:271-7.
30. Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. Alcohol Clin Exp Res. 2005;29:121S-131S.
31. Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2005;3:95-107.
32. Tangkijvanich P, Yee HF Jr. Cirrhosis can we reverse hepatic fibrosis? Eur J Surg Suppl. 2002;587:100-12.
33. Holstege A, Kollinger M, Scholmerich J. The role of fibrogenesis in the pathogenesis of portal hypertension. In: Holstege A, Hahn EG, Scholmerich J ed. Portal hypertension. Netherland: Kluwer Academic Publishers. 1955:33-50.
34. Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: From bench to bedside. J Gastroenterol Hepatol. 2002;17(s):300-5.
35. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem. 2000;275:2247-50.
36. Bataller R and Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005;115:209-18.
37. Lee KS. Mechanism of liver fibrosis. In: Kim BS, ed. Liver fibrosis. Kunja. 2000:27-42.
38. 권영오. 간섬유화 치료의 최신지견. 대한간학회 제3차 Postgraduate Course. 2005:33-9.
39. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진이 TGF-β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(3):141-55.
40. 김성아, 우홍정, 김영철, 이장훈. 인진이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):177-88.
41. 강병기, 홍석의. 六鬱湯 및 散鬱湯이 DMN 및 담도결찰로 유발된 간경변증에 미치는 영향. 제2회 한중학술대회(간장병)논문집. 대한한외

- 사협회. 1995:91-122.
42. 이지현, 김영철, 이장훈, 우홍정. 청간해주탕이 TGF- β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):93-106.
 43. 전재현, 이장훈, 김영철, 우홍정. 청간해주탕이 알코올 유발 간섬유화와 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(2):469-89.
 44. 최은경, 이장훈, 김영철, 우홍정. 단삼이 간성상 세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(2):229-310.
 45. Kimura K, Ando K, Ohnishi H, Ishilawa T, Kakumu S, Takemura M, et al. Immunopathogenesis of hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by repeatedly administered concanavalin A. *Int Immunol*. 1999;11:1491-500.
 46. Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol*. 1986;251:G176-G180.
 47. Giavarotti L, D'Almeida V, Giavarotti KA, Azzalis LA, Rodrigues L, Cravero AA, et al. Liver necrosis induced by acute intraperitoneal ethanol administration in aged rats. *Free Radic Res*. 2002;36:269-75.
 48. Jeong DH, Jang JJ, Lee SJ, Lim IK, Lee MJ, et al. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl₄ or thioacetamide. *J Gastroenterol*. 2001;36:24-32.
 49. Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *Journal of Hepatology*. 1985;1:489-99.
 50. Xiangnong Li, Irving S, Benjamin, Barry Alexander. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *Journal of Hepatology*. 2002;36:488-93.
 51. Muller A, Machnik F, Zimmermann T, Schubert H. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats unusefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol*. 1988;34:229-36.
 52. Jang KT, Lee MS, Jung IP, Kim MR, Jang JJ. Effect of pentoxifylline on liver fibrosis and cell cycle related proteins in thioacetamide-induced rat cirrhosis. *Korean J Hepatol*. 2001;7:281-91.
 53. Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1988;3:112-20.
 54. 정규원. 만성간질환의 미세구조-간섬유조직증식과 간유동의 정상세포. 대한간학회지. 2002;8(3):343-53.
 55. Gianluca Svegliati Baroni, Letizia D' Ambrosia et al. Interferon γ decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology*. 1996;23(5):1189-99.
 56. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102:538-49.
 57. Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis-fact or fantasy? *Hepatology*. 2006;43(s):82-8.
 58. Friedman SL, Maher JJ, Bissell DM. Mechanism and therapy of hepatic fibrosis: report of the AASLD single topic basic research conference. *Hepatology*. 2000;32:1403-8.
 59. Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaca M, Jones

- EH, Iredale JP, Arthur MJ. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology*. 1999;30:977-86.
60. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G, Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and onoparenchymal cells of rat liver regulation by TNF-alpha and TNF-beta. *J Hepatol*. 1999;30:48-60.