

鬱금이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향

김세훈, 우홍정, 김영철, 이장훈
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Inhibitory Effect of *Curcuma Longae Radix* on Fibrogenesis in Hepatic Stellate Cell Line, LX-2

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

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate the anti-fibrogenic effect of *Curcuma Longae Radix* on human hepatic stellate cells.

Materials and Methods : Hepatic stellate cells (LX-2) were treated with various concentrations of *Curcuma Longae Radix* extract for 24, 48, and 72 hours. It was extracted with distilled water. After the treatment, cell viability, proliferation, cell cycle analysis, procollagen levels and the mRNA of the ASMA, TIMP1, TIMP2, MMP2, collagen type 1a, PDGF-receptor-beta and TGF-beta were measured by using MTT assay, BrdU assay, RT-PCR, and procollagen type 1 C-peptide EIA kit.

Results : The viability of HSCs decreased in the 48 hours group, and proliferation of HSCs decreased as the concentration increased. In the cell cycle analysis, *Curcuma Longae Radix* decreased the ratio of M phase, and increased the ratio of apoptosis, G0/G1 and S phase. In the RT-PCR, the mRNA expression of the collagen type 1a and ASMA decreased with the *Curcuma Longae Radix* treatment. The production of procollagen by the HSCs was decreased by the treatment of *Curcuma Longae Radix* with high dose.

Conclusion : These results suggest that *Curcuma Longae Radix* is helpful in the treatment of liver fibrosis as well as liver cirrhosis.

Key words : *Curcuma Longae Radix*, liver cirrhosis, liver fibrosis, Hepatic Stellate Cell

1. 緒 論

만성 간질환은 국내에서 성인병 및 사망의 중요한 원인으로, 2006년 보건복지부 통계자료에 따르면 만성질환에 의한 사망률 중 간질환에 의한 사망률은 10만명 당 15.5명으로 5위를 차지하고 있

며, 간암의 발생률은 전체 암 중에서 4위를 차지하고 있다¹.

간섬유화(Liver fibrosis)는 여러 가지 원인에 의해 활성화된 간성상세포(Hepatic stellate cell, HSC)가 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 이상증식반응을 나타내어 collagen이 축적되고 섬유화가 촉진되는 것으로 비가역적인 간경변증과는 달리 가역적인 특징을 가지고 있다².

최근 간섬유화의 기전, 치료에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다³. 최근 실험적으로 보고된 약

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

물은 gleevec⁴, estrogen⁵ 등이 있고, 한약의 간섬유화에 미치는 영향 역시 활발히 진행되고 있는데, 최 등은 단삼⁶, 김 등은 인진⁷이 간섬유화를 억제한다고 보고하였고, 鬱金의 성분 중 curcumin은 간성상세포의 활성화를 억제함으로써 인해 세포와 ECM 증식을 억제하여 간섬유화에 효과가 있다는 보고⁸⁻⁹의, 항산화와 간보호효과¹⁰, 간세포암에 대한 항혈관생성 효과¹¹에 대한 보고 등이 있다.

이에 저자는 한국의 한의학 임상에서 활용하게 되는 생약제제로서의 鬱金 추출물이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향을 관찰하고자, 간성상세포의 활성도와 증식을 관찰하기 위해 MTT Assay와 BrdU Assay, Cell Cycle Analysis를 시행하였고, collagen의 합성량 및 단백질성에 직접 관련이 있는 mRNA의 발현량을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 方法

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전의 한약규격집¹²에 근거하여 경희의료원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였다.

Herb	Scientific name	Volume(g)
鬱金	Curcumae Longae Radix	100

2) 검액의 조제

鬱金 100g을 환류추출기에 넣고 1000cc의 증류수를 더하여 관류냉각장치를 부착한 상태로 2시간씩 전탕하였다. 이 전탕액을 Whattmann Paper로 여과한 후 rotary evaporator로 감압농축하고 동결 건조하여 11.7g(증류수 추출)의 건조추출물을 얻어서 실험에 사용하였다.

이렇게 얻은 약재는 세포배양액에 100mg/ml의 농도로 녹이고 0.22 μ m syringe filter를 이용하여 멸

균한 다음 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

3) 시 약

Fetal Bovine Serum(FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Antibiotics 등은 Gibco사(CA, USA), n-Propanol, Thiazoly Blue Tetrazolium(MTT) 등은 Sigma사(MO, USA), 5-Bromo-2'-deoxy Uridine Labeling and Detection Kit(BrdU Kit)은 Roche사(Mannheim, Germany), Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit는 TaKaRa사(Shiga, Japan), RNeasy Mini Plus Kit는 Qiagen사(CA, USA), Taq DNA polymerase는 Bioneer사(Deajoen, Korea), Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) System은 Promega사(WI, USA) 등의 제품을 사용하였고, 기타 plastic wares는 SPL사(Korea) 제품을 이용하였다.

2. 방 법

1) Cell line

사람의 간성상세포주인 LX-2 cell line(kind gift of Dr. Scott L. Friedman)을 이용하였다. 세포는 1% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamine이 포함된 DMEM배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂의 incubator에 배양하였다.

2) 약제처리

0.2% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamine이 포함된 배지에 약제를 필요한 농도로 희석하여 처리하였다.

3) 세포활성 측정(MTT Assay)

24-well plate에 LX-2 cell을 분주하고 24시간동안 배양 후 농도별로 약제를 처리하고 24시간, 48시간별로 MTT Assay를 하였다.

MTT powder를 2mg/ml의 비율로 DMEM에 희석하여 MTT solution을 만들고 각 well에 200 μ l의 MTT solution을 넣고 45분 동안 incubator(항온배양기)에 배양하였다. Medium을 제거하고 각 well에 100 μ l의 n-propanol을 넣은 후 5-10분간 흔들어

주면서 세포를 충분히 녹였다. 각 well에서 용액을 50 µl씩 추출하여 96-well plate로 옮긴 후 ELISA Reader로 570 nm파장으로 흡광도를 측정했다.

4) 세포증식능력 측정(BrdU Assay)

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III를 이용하여 측정하였다.

96-well plate에 세포를 분주하고 24시간 후 0 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml의 농도로 약제처리를 하고 24시간, 48시간, 72시간별로 BrdU Assay를 하였다. 즉, 각 well에 BrdU labeling solution을 추가하고 37°C, 5% CO₂의 incubator에서 4시간 배양한 후, Culture medium을 제거하고 washing medium을 넣어 세포를 씻어낸 후 pre-cooled fixative를 넣고 세포를 -15 ~ -25 °C의 온도에서 30분간 고정시켰다. 다음 Fixative를 제거하고 washing medium으로 씻어낸 후 nucleases working solution을 넣고 37°C의 waterbath에서 30분간 배양하였다. 이후, Nucleases working solution을 제거하고 wash medium으로 씻어낸 후 anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution을 넣고 incubator에서 30분간 배양하였다. 그 뒤 Antibody conjugate를 제거하고 washing buffer로 씻어낸 후 peroxidase substrate를 넣었다. 반응 양성 샘플들이 초록빛을 나타낼 때까지 실온에서 빛을 차단한 상태로 30분간 샘플들을 배양하였다. 마지막으로, 490nm의 참조 파장에서 405nm의 파장에서 microplate reader로 샘플들의 흡광도를 측정하였다.

5) 세포주기 분석(Cell cycle analysis)

鬱금이 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 cell cycle analysis를 시행하였다. 먼저, 6-well plate에 세포를 분주하고鬱금을 농도별로 처리하고 48시간동안 incubate한 뒤 Trypsin을 섞고 PBS로 씻는다. 뭉쳐진 cell을 0.3ml의 PBS에 섞은 뒤 100% ethanol 0.7ml를 넣고 4°C에 보관한 뒤 PBS로 씻은 뒤 0.5ml의 PBS에 넣는다. 그리고 10 µl의 RNase A를 넣고 37°C에서 1시간동안 배양한 뒤 20 µl의 propidium iodide를 염색한 것을 FACScalibar

를 사용하여 DNA성분의 분석계산을 시행하고 Modifit cell cycle analysis software를 사용하여 분석하였다.

6) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

(1) RNA 추출

6-well plate에 LX-2 cell을 분주하고 다음날 한 장의 plate에서 3개 well씩 같은 농도로 0 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml의 농도별로 약제를 처리한 후 24시간, 48시간, 72시간별로 Qiagen사의 RNeasy Mini Plus Kit를 이용하여 RNA를 분리하였다.

(2) Complementary DNA(cDNA) 합성

Promega사의 Reverse Transcription System을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

1 µg의 RNA를 DEPC-처리된 증류수에 10 µl 되게 조정된 뒤 70°C에서 5분간 가열한 후 얼음에 5분간 두었다. 2 µl의 10× reaction buffer(100 mM Tris-HCl, pH9.0 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 4 µl의 25 mM MgCl₂, 2 µl의 10 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.5 µl(40 unit/µl)의 ribonuclease (RNase) inhibitor, 15 unit의 AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 가하여 최종량을 20 µl로 하였다. 반응조건은 42°C 1시간, 95°C 5분간 4°C에서 5분간으로 하여 반응시켰다. 합성된 cDNA를 -80°C에 보관하였으며 필요할 때마다 사용하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로는 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였고, target gene으로는 ASMA(Alpha-Smooth Muscle Actin), TIMP1, TIMP 2, MMP2, Collagen type 1a2, PDGF receptor beta, TGF-beta receptor 1 gene을 사용하였으며 각 primer의 sequence는 다음과 같다.

· Oligonucleotide Primers Used for Quantitative RT-PCR Analysis

(All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Primer	Sequence	Cycle No.	product size
ASMA	sence	5'- AGG CAC CCC TGA ACC CCA A -3'	27	102
	antisence	5'- CAG CAC CGC CTG GAT AGC C -3'		
TIMP1	sence	5'- TGA CAT CCG GTT CGT CTA CA -3'	33	122
	antisence	5'- TGA TGT GCA AGA GTC CAT CC -3'		
TIMP2	sence	5'- AAG CGG TCA GTG AGA AGG AA -3'	30	137
	antisence	5'- GGG GGC CGT GTA GAT AAA CT -3'		
MMP2	sence	5'- CCC CAA GCT CAT CGC AGA T -3'	33	62
	antisence	5'- GGT CCA CGA CGG CAT CC -3'		
Colla2	sence	5'- GGC TTC CCT GGT CTT CCT GG -3'	30	118
	antisence	5'- CCA GGG GGT CCA GCC AAT -3'		
PDGFRB	sence	5'- CCA GAA GCC ATC AGC AGC AAG -3'	33	76
	antisence	5'- AGG CCC TGA GAG ATC TGT GG -3'		
TGFBRI	sence	5'- CGA GTG CCA AAT GAA GAG GAC C -3'	30	110
	antisence	5'- AAA CCT GAG CCA GAA CCT GAC G -3'		
GAPDH	sence	5'- GGT GAA GGT CGG AGT CAA CGG -3'	25	105
	antisence	5'- TGA AGG GGT CAT TGA TGG CAA CA -3'		

(4) PCR

PCR의 방법은 2 μ l의 cDNA에 5 μ l의 10 \times PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 4 μ l의 dNTP, 20 pmol의 sense와 antisense primers, 2 unit의 Taq DNA polymerase를 넣고 멸균된 증류수로 총 volume이 50 μ l가 되도록 조정하였다. PCR 조건은 유전자증폭기(Biometra, Gottingen, Germany)를 이용하여 denaturation은 95 $^{\circ}$ C로 5분간 시행한 후 annealing은 55 $^{\circ}$ C에서 1분간, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 하고 이후로 각 유전자에 따라 24~32주기를 시행하였으며 마지막 연장은 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 증폭하였다. 10 μ l의 PCR 생성물에 2 μ l의 6 \times gel loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% sucrose)을 혼합하여 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide가 첨가된 2% 한천 gel에 0.5 \times TBE(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 이용하여 90 volt로 1시간 동안 전기영동을 하였으며 Gel Doc 1000 gel documentation system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 band를 확인하였다.

7) Procollagen Type 1 C-Peptide EIA

Procollagen Type 1 C-Peptide EIA Kit을 사용하였으며, 제작사의 메뉴얼에 따라서 측정하였다.

8) 통계처리

Microsoft사의 Excel program을 이용하여 T-test를 수행하였으며, p<0.05인 경우를 유의성이 있는 것으로 보았다.

III. 結果

1. 鬱금이 간성상세포의 활성화에 미치는 영향(MTT Assay)

鬱금이 간성상세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해, 鬱금을 시간별 및 농도별로 처리한 결과 24시간에서는 유의성이 인정되지 않았으며, 48시간에는 50 μ g/ml부터 효과가 있는 것으로 나타나 농도의존적으로 세포 활성화도의 감소 경향이 나타났다(Table 1).

2. 鬱금이 간성상세포의 증식에 미치는 영향(BrdU Assay)

鬱금이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향

鬱금이 간성상세포의 증식에 미치는 영향을 확인해보기 위해,鬱금을 증류수로 추출하여 24, 48, 72시간 동안 0, 50, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 결과 모든 농도 및 모든 시간에서 유의성있는 억제

효과가 나타나 모두 고농도에서 세포 증식에 영향을 미침을 관찰할 수 있었다. 특히 시간보다는 농도의존적으로 유의성이 높아짐을 관찰할 수 있었다(Table 2).

Table 1. Effect of Curcumae on LX-2 Cell Viability(MTT Assay)

Time \ $\mu\text{g}/\text{ml}$	0	10	50	100	200	500
24h	0.36 \pm 0.02	0.36 \pm 0.014	0.35 \pm 0.01	0.36 \pm 0.03	0.33 \pm 0.04	0.34 \pm 0.03
48h	0.39 \pm 0.02	0.38 \pm 0.020	0.35 \pm 0.03*	0.35 \pm 0.01*	0.33 \pm 0.01**	0.30 \pm 0.02**

Values represent mean \pm SD of O.D.(optic density) of each samples.

P values compared with the none treated

* : P<0.05, ** : P<0.01

Table 2. Effect of Curcumae on LX-2 Cell Proliferation(BrdU Assay)

Time \ $\mu\text{g}/\text{ml}$	0	50	200	500
24h	2.05 \pm 0.21	1.72 \pm 0.27*	1.68 \pm 0.28*	1.30 \pm 0.23**
48h	0.99 \pm 0.16	0.77 \pm 0.15*	0.71 \pm 0.15**	0.58 \pm 0.12**
72h	1.40 \pm 0.23	1.09 \pm 0.15*	1.02 \pm 0.23*	0.81 \pm 0.09**

Values represent mean \pm SD of O.D.(optic density) of each samples.

* P values compared with the none treated

* : P<0.05, ** : P<0.01

3.鬱금이 간성상세포의 세포주기에 미치는 영향 (Cell Cycle Analysis)

鬱금이 세포주기에 미치는 영향을 관찰한 결과鬱금의 투여는 Apoptosis의 비율과 세포분열을 하

지 않는 기간인 G0/G1 phase는 증가되었고 G2/M phase는 낮게 나타나鬱금이 세포분열을 억제함을 확인할 수 있었다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Effect of Curcumae on LX-2 Cell Cycle Analysis

Phase \ $\mu\text{g}/\text{ml}$	0	50	100	200	500
Apop	1.69	2.09	3.06	2.76	2.29
G0/G1	44.52	50.48	50.80	52.34	51.52
S	7.53	8.11	8.78	10.55	11.37
G2/M	46.26	39.32	37.36	34.35	34.82
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Values represent % of each phase

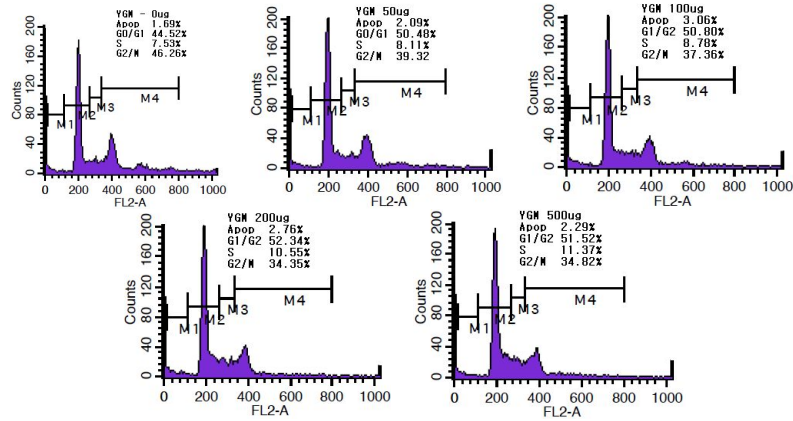


Fig. 1. Effect of Curcumae on LX-2 cell cycle analysis

4. 鬱金이 간섬유화관련 유전자 발현에 미치는 영향(RT-PCR)

鬱金이 간성상세포의 활성화와 collagen 합성에 미치는 영향을 유전자의 변화양상을 통하여 파악하여 보고자 GAPDH를 house keeping gene으로 하고, 촬영된 이미지를 바탕으로 0µg/ml과 GAPDH를 기준으로 비율을 구하여 수치로 나타내었다.

鬱金투여에 의하여 Collagen Type 1a2에서는 대조군에 비해 유전자의 발현이 감소됨이 관찰되었으나, ASMA에서는 24, 48시간에서만 감소하고 72 시간에서는 오히려 증가함이 관찰되었고, 나머지 primer에서는 일정한 경향성을 발견할 수 없었다 (Table 4-1~4-3, Fig. 2).

Table 4-1. Effect of Curcumae on mRNA Expression in LX-2 Cells

Gene	µg/ml	0	50	200	500
ASMA	1	0.853	0.846	0.795	
TIMP1	1	1.044	1.067	1.011	
TIMP2	1	0.978	0.782	0.794	
MMP2	1	0.891	0.868	0.908	
Collagen1a2	1	0.950	0.976	0.965	
PDGFRB	1	1.019	1.036	0.912	
TGFB1	1	1.000	0.936	0.872	

Values represent each gene/GAPDH ratio
Cells were treated with curcumae with different doses for 24hrs.

Table 4-2. Effect of Curcumae on mRNA Expression in LX-2 Cells

Gene	µg/ml	0	50	200	500
ASMA	1	0.967	0.810	0.849	
TIMP1	1	1.042	1.066	1.142	
TIMP2	1	1.162	1.005	1.005	
MMP2	1	1.018	1.067	1.034	
Collagen1a2	1	0.935	0.924	0.743	
PDGFRB	1	1.084	1.080	1.007	
TGFB1	1	0.935	0.874	1.021	

Values represent each gene/GAPDH ratio
Cells were treated with curcumae with different doses for 48hrs.

Table 4-3. Effect of Curcumae on mRNA Expression in LX-2 Cells

Gene	µg/ml	0	50	200	500
ASMA	1	1.057	1.046	0.967	
TIMP1	1	0.993	0.999	0.930	
TIMP2	1	0.957	0.680	0.743	
MMP2	1	1.096	0.988	1.035	
Collagen1a2	1	0.975	0.901	0.927	
PDGFRB	1	0.829	0.944	0.821	
TGFB1	1	0.926	1.095	1.037	

Values represent each gene/GAPDH ratio
Cells were treated with curcumae with different doses for 72hrs.

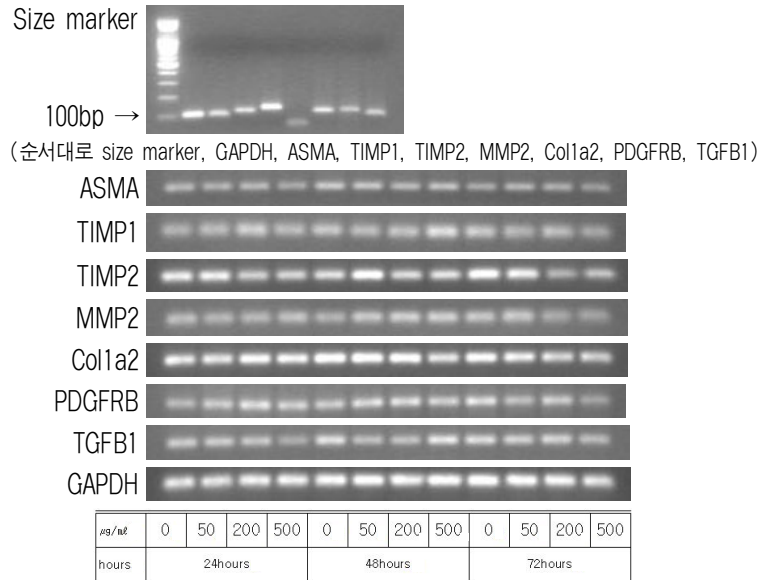


Fig. 2. Effect of Curcuma on mRNA expressions after treatment with different time and doses.

Upper panel shows size marker and each gene expressions levels after 25 cycles of PCR. Lower panel shows relative gene expression after PCR cycles adjusted according to the result of upper panel.

5. 鬱금이 procollagen 단백질 합성에 미치는 영향

24, 48 시간 동안 약재를 처리한 후 나타난 결과, 24시간 처리군에서의 200µg/ml 군과 48시간 처리군의 500µg/ml에서 유의하게 procollagen 생성량이 감소함을 확인할 수 있었다(Table 5).

Table 5. Effect of Curcuma on Procollagen Production(EIA)

ng/ml	0	10	50	100	200	500
Time						
24	179.33 ±18.45	166.89 ±1.41	149.67 ±12.98	155.92 ±3.59	144.24 ±16.24*	123.54 ±1.93
48	231.28 ±3.06	226.81 ±22.21	211.99 ±10.28	181.38 ±18.02	183.73 ±11.92	152.78 ±6.33*

Values represent mean ±SD of produced procollagen (ng/ml) converted from the O.D. of each sample using standard curve made with protein standard provided by the company.

Correlation equation is $y = ((A-D)/(1+(x/C)^B)) + D$

* : P<0.05

IV. 고찰 및 결론

우리나라 간경변증 환자들의 원인 질환은 B형 간염 바이러스에 의한 만성 간질환이 44.5%로 가장 많고 알코올성에 의한 경우가 다음 순위를 차지한다¹³. 이와 같이 우리나라에서는 만성 바이러스성 간질환의 유병률이 높아서 이에 따라 간경변증의 유병률도 높은 것으로 알려져 있다¹.

간섬유화는 여러 종류의 간 손상에 의한 상처재생 과정의 결과로 나타나는 현상이며 가역적인 것인지 아닌지에 대해서는 논란이 많이 있어 왔으나 최근 연구에서는 가역적이라는 보고¹⁴와 함께 실험적으로 유발된 간섬유화에서 섬유화의 호전을 보인 보고가 나오고 있다¹⁵.

서양 의학에서는 간 섬유화증의 치료를 위해 섬유화의 원인에 따라 치료방향이 조금씩 달라지게 되는데, B형, C형 바이러스성 간염에 대해서는 항바이러스제의 사용으로 항바이러스 효과는 물론

항섬유화 효과까지 기대하려는 노력이 진행되고 있다. B형간염에 라미부딘을 사용함으로써 조직학적 소견의 개선의 보고¹⁶를 한 것과, C형간염에 인터페론 및 리바비린을 이용하여 조직학적 소견의 개선을 보고¹⁷한 것이 있다. 자가면역성 간염과 급성 알코올성 간염에서 유일하게 적응이 되는 부신피질 호르몬제는 섬유화의 진행 과정 중 나타나는 염증반응에 대한 억제제로 사용된다¹⁸. 그 외 실험적으로 연구되고 있는 항 섬유화 약제는 gleevec⁴, estrogen⁵, pentoxifylline, IL-18 antibody¹⁹ 등이 있다.

한약재에 대한 간섬유화 억제 효과 보고 역시 많은 연구가 진행중에 있는데, 그 중 鬱金은 생강과에 속하는 다년생 약용 식물로 Curcumae Longae Radix의 덩이뿌리를 건조한 것이다. 주요 성분으로는 curcumin, demethoxy curcumin, bisdemethoxy curcumin 등이다. 性寒, 味辛苦하며 活血止痛, 行氣解鬱, 清心開竅, 清熱涼血, 利膽退黃시키는 효능이 있으며, 瘧疾, 疔瘡, 癰疽, 疔瘡, 癰疽, 疔瘡, 癰疽 등에 사용되고 있다²⁰.

鬱金の 간에 미치는 영향에 대한 기존의 연구로는 TGF-beta 및 산화스트레스의 조정으로 간경변증을 예방, 치료할 수 있음을 보고²¹와, 鬱金이 쥐의 간에 aflatoxin으로 유발된 지질과산화물을 개선시킨다는 보고²²가 있다. 간섬유화에서 鬱金の 효과에 대한 보고는 鬱金の NF-kB와 ERK signaling을 억제함으로써 Connective Tissue Growth Factor(CTGF)를 억제하는 기전의 보고²³와, PPAR- γ 를 활성화시켜 간성상세포의 활성화를 막는다고 보고²⁴가 있고, 鬱金이 MMP-2와 MMP-9의 활성 및 PPAR- γ 신호전달을 활성화시킴으로서 간성상세포의 활성을 막는다는 보고²⁵도 있었다.

현재까지 鬱金을 실험약재로 하여 보고된 논문들 대부분은 동물의 간세포를 대상으로 한 것으로, 인체 간에서 유래한 세포를 대상으로 약재를 처리하여 그 결과를 보고한 것은 드문 실정이다. 본 연구에서는 鬱金을 인체 간성상세포에서 유래한 세

포주에 직접 투여하여 그 효과를 검증하였다.

한약재를 동결건조하고 다시 배지에 녹여서 세포에 처리할 때 약재별로 나타나는 세포독성은 약재에 따라 다양한 차이를 보이므로 세포독성은 나타나지 않으면서 약 효과를 관찰할 수 있는 농도의 설정이 중요하다. 지금까지 각종 논문에서 소개된 일반적인 한약재의 농도는 일반적으로 500 μ g/ml 이하로 설정되어 이용되어 온 것을 참고로 하여 본 연구에서는 500 μ g/ml을 최고 농도로 설정하여 시간별로 약재를 투여하였다.

鬱金이 간성상세포의 viability에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT Assay를 시행하였다. MTT는 살아있는 세포의 mitochondria에서 대사 작용이 일어나는 화합물이며, 대사 작용이 일어난 이후에는 그 색이 변하게 되는데, 각 well의 colorimetric activity를 측정함으로써 실험을 하는 방법이다. 오직 살아있는 세포에서만 이 변화가 생기게 되므로 MTT Assay를 통해 간성상세포의 viability를 알아볼 수 있다. 본 연구에서는 약재의 최고 농도를 500 μ g/ml로 설정하였는데, 실험 결과 48시간 처리군에서도 급격한 세포활성의 저하는 관찰되지 않아서 세포독성은 나타나지 않는 안전성이 높은 약재로 판단되었다. 의미있는 세포활성의 변화는 약재를 처리한 후 48시간에서 유의성 있는 감소 경향이 나타났다(Table 1).

간성상세포의 증식을 확인해보기 위해 BrdU Assay를 시행하였다. 실험결과 모든 농도에서 세포 증식이 억제됨을 관찰할 수 있었고, 특히 농도가 높을수록 유의성 역시 높아짐을 관찰할 수 있었다(Table 2).

鬱金이 세포주기에 미치는 영향을 확인해보기 위해, 鬱金을 증류수로 추출하여 24시간 동안 농도별로 처리한 결과 Apoptosis의 비율과 세포분열을 하지 않는 기간인 G0/G1 기간이 0 μ g/ml group보다 鬱金을 투여한 group에서 높게 나타나고 반대로 분열하는 기간인 G2/M기간은 鬱金을 투여한 group에서 낮게 나타나 鬱金이 세포분열을 억제함

을 확인할 수 있었다(Table 3, Fig. 1). 이 결과는 BrdU Assay의 결과와도 밀접한 연관이 있는데, BrdU Assay를 통하여 전반적인 세포의 증식이 억제됨을 알 수 있었고, Cell cycle analysis를 통하여는 G0/G1 arrest를 통하여 세포분열 중 가장 중요한 부분 중 하나인 세포분열주기에서鬱금이 분열을 억제하고 있음을 알 수 있었다.

鬱금이 간성상세포의 collagen 합성에 미치는 영향을 유전자의 변화양상을 통하여 파악하여 보고자 RT-PCR을 시행하였다. GAPDH를 house keeping gene으로 하고, 간손상시 늘어나는 collagen 중의 하나인 Collagen type 1 α 2, 성상세포의 활성화에 증가하는 것으로 알려진 alpha-Smooth Muscle Actin (ASMA), Protein derived growth factor receptor (PDGFR), Transforming Growth Factor beta receptor(TGFBR)와 기존의 collagen 골격을 이루고 있는 Collagen type IV를 분해하는 물질 중 하나인 Matrix metalloprotease-2(MMP-2), 간섬유화에서 MMP를 억제하는 것으로 알려진 Tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP1, TIMP2)를 측정하였고, 촬영된 이미지를 바탕으로 0 μ g/ml과 GAPDH를 기준으로 비율을 구하여 수치로 나타내었다(Table 4.1-3, Fig. 2). 실험 결과 Collagen type 1 α 2는 24, 48, 72시간에서 모두 합성이 떨어지는 결과를 보였고, ASMA는 24, 48시간에서는 합성이 떨어졌으나, 72시간에서는 오히려 상승하는 결과를 보였다. 그 외 다른 primer에서는 일정한 경향성이 없었다. 이는鬱금이 Collagen type 1 α 2의 합성을 지속적으로 막는 효과가 있는 반면, ASMA의 결과를 볼 때 간성상세포의 활성화를 약 48시간까지는 저해하는 효과가 있음을 알 수 있다. 실제 임상에서 한약투여를 1일 2-3회 하는 것이 가장 흔한 처방이라고 볼 때, 약 8-12시간마다 약물성분이 인체로 들어간다는 것을 고려하면鬱금의 ASMA 발현을 억제하는 것 역시 의의가 있다고 볼 수 있다.

Collagen 합성의 정량적 검출을 알아보기 위해 Procollagen assay를 시행하였다. 24, 48시간 동안

약제를 처리한 후 나타난 결과, 24시간 처리군에서의 200 μ g/ml 군과 48시간 처리군의 500 μ g/ml에서 유의하게 procollagen 생성량이 감소함을 확인할 수 있었다. 유의하지 않은 부분 역시 농도가 높아 질수록 평균값은 하강함을 알 수 있고, 24시간 500 μ g/ml 군의 경우에는 200 μ g/ml 군 보다 평균값은 낮았지만 통계적 유의성은 발견할 수 없었다(Table 5). 이 결과를 통해서鬱금이 상대적으로 고농도에서 간성상세포의 procollagen 합성을 억제함을 확인할 수 있다.

서론에서 언급한 Fu Y. 등8 과Chen A 등9의 논문은 쥐의 간성상세포를 사용하여 IFN-gamma, IL-6, PPAR-gamma, CTGF 등을 연구한 것에 비해 본 연구에서는 사람의 간성상세포를 사용하여 인체에서의 환경과 더욱 유사한 상태에서 연구가 진행되었으며, 세포의 활성화, 증식능력 및 cell cycle을 분석하고, RT-PCR의 primer 역시 여러 가지를 실험하여 인체 간성상세포주인 LX-2 cell에 대한鬱금의 효과를 광범위하게 연구하였다.

이상에서鬱금은 간섬유화에 세포 활성화도와 세포 증식도를 억제하고, 세포주기에서 세포분열을 억제하며, collagen 합성 및 섬유화 인자를 억제하는 것으로 관찰되었다. 그러나 본 연구는 간을 구성하는 여러 세포 중에서 섬유화에 가장 관계가 깊은 것으로 알려진 간성상세포주에 대한 것으로 생체에서의 상황과 동일하다고 볼 수는 없으며 추가적인 동물실험을 통하여 생체에서의 반응에 대한 보다 확실한 정보를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 다만 울금이 한의학의 임상에서 장시간 사용되어 왔던 점을 고려한다면 임상에서의 적용에 무리는 없을 것으로 생각되며, 아울러鬱금의 간섬유화 억제에 대한 보다 자세한 작용기전에 대하여는 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 통계청, 국민건강영양조사 2007.

2. Kwan Sik Lee. Hepatic Fibrogenesis. *Kor J Hepatology*. 2005;11(2s):9-19.
3. Friedman SL. Hepatic fibrosis-Overview. *Toxicology* 2008.
4. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, et al. Amelioration of liver fibrogenesis by dual inhibition of PDGF and TGF-beta with a combination of imatinib mesylate and ACE inhibitor in rats. *Int J Mol Med*. 2006;17(5):899-904.
5. Shimizu I, Kohno N, Tamaki K, Shono M, Huang HW, He JH, et al. Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13(32):4295-305.
6. 최은경, 이장훈, 김영철, 우홍정. 단삼이 간성상 세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2008;29(2):299-310.
7. 김성아, 우홍정, 김영철, 이장훈. 인진이 간성상 세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 2008;29(1):177-88.
8. Yumei Fu, Shizhong Zheng, Jianguo Lin, Jan Ryerse, Anping Chen. Curcumin protects the Rat Liver from CCl4-caused injury and Fibrogenesis by Attenuating Oxidative Stress and Suppressing Inflammation. *Mol Pharmacol*. 2008;73:399-409.
9. A Chen, S Zheng. Curcumin inhibits connective tissue growth factor gene expression in activated hepatic stellate cells in vitro by blocking NF- κ B and ERK signaling. *Br J Pharmacol*. 2008;153(3):557-67.
10. Wu SJ, Lin YH, Chu CC, Tsai YH, Chao JC. Curcumin or saikosaponin a improves hepatic antioxidant capacity and protects against CCl4-induced liver injury in rats. *J Med Food*. 2008;11(2):224-9.
11. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Changtam C, Suksamrarn A, Patumraj S. Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2008;14(13):2003-9.
12. 식품의약품안전청. *대한약전의 한약규격집*. 서울: 1985, p. 78.
13. EM Jeong, SG Hwang, HH Park, JH Park, HT Kim, SW Oh et al. The Analysis of Mortality Rate According to CTP Score and MELD Score in Patients with Liver Cirrhosis. *Kor J Hepatology*. 2003;9(2):98-106. 2005;26(1):1-11.
14. Authur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1525-8.
15. Issa R et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution with matrix cross-linking. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1795-808.
16. Lai CL, Chien RN, Leung NW, et al. A one-year trial fo lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 1998;339:61-8.
17. Davis G, Estevan-Mur R, Rustgi V, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 1998;339:1493-9.
18. Gong Y, Gluud C. Colchicine for primary biliary cirrhosis: a Cochrane Hepato-Biliary Group systematic review of randomized clinical trials. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(8):1876-85.
19. Khan F, Peltikian KM, Peterson TC. Effect of interferon-alpha, ribavirin, pentoxifylline, and interleukin-18 antibody on hepatitis C sera-stimulated hepatic stellate cell proliferation. *J Interferon Cytokine Res*. 2008;28(11):643-51.

20. 김호철. 한약약리학. 집문당; 2001, p. 326-9.
21. Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Vergara P, Moreno MG et al. Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl₄ in rats: role of TGF-beta modulation and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22(4):417-27.
22. Verma RJ, Mathuria N. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced lipid peroxidation in liver and kidney of mice. *Acta Pol Pharm.* 2008;65(2):195-202.
23. Chen A, Zheng S. Curcumin inhibits connective tissue growth factor gene expression in activated hepatic stellate cells in vitro by blocking NF-kappaB and ERK signaling. *Br J Pharmacol.* 2008;153(3):557-67.
24. Xu J, Fu Y, Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 2003;285(1):G20-30.
25. Cheng Y, Ping J, Xu LM. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chin Med J(Engl).* 2007;120(9):794-801.