

當歸가 간성상세포의 섬유화 기전 억제에 미치는 영향

손현수, 김영철

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Inhibitory Effect of *Angelica Gigantis Radix* on Fibrogenesis in Rat Hepatic Stellate Cells

Hyun-soo Son, Young-chul Kim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate the anti-fibrogenic effect of *Angelica Gigantis Radix* on cultured rat hepatic stellate cells.

Materials and Methods : Hepatic stellate cells(HSC-T6) were treated with various concentrations of *Angelica Gigantis Radix* extract for both 24 and 48 hours. The extraction was done either with distilled water or 80% EtOH. After the treatment, cell viability, cell proliferation, procollagen production and the mRNA expression of the ASMA, TIMP1, TIMP2, procollagen Type 1a2, and Cytokine IL-6 production were measured by using MTT assay, BrdU assay, RT-PCR, procollagen Type I C-peptide EIA and IL-6 ELISA assay.

Results : The cell viability treated with water extraction was significantly increased, but there were no significant changes treated with 80% EtOH extraction. The cell proliferation treated with water extraction decreased only in the 24 hours group, while there were significant decreases either in the 24 and 48 hours groups treated with 80% EtOH extraction. The mRNA expressions of the ASMA, TIMP2 and procollagen 1a2 decreased in a concentration-dependent manner in the 48 hours group. Procollagen production decreased in a concentration-dependent manner in both the 24 and 48 hours groups. Cytokine IL-6 production increased in a concentration-dependent manner in both the 24 and 48 hours groups.

Conclusion : These results suggest that *Angelica Gigantis Radix* is beneficial in the treatment of cirrhotic patients as well as for patients with chronic hepatitis.

Key words : *Angelica Gigantis Radix*, liver cirrhosis, liver fibrosis, Hepatic Stellate Cell(HSC)

1. 緒論

2008년 우리나라 사망원인 통계 결과에 따르면, 전체 사망원인 중 간질환 사망률은 8위에 해당하며, 남자(23.3명)가 5위, 여자(5.7명)는 10위로 남녀 간에 순위차이가 가장 큰 사인으로 보고되었고, 특히 40~50대의 경우는 간질환이 사망원인 순위 각

각 3위와 2위를 차지하고 있어 아직도 주요 사망원인 질환 중 하나로 분류되고 있다¹.

간섬유화는 만성적인 간손상에 따른 창상 치유의 과정으로서, 결과적으로 세포외간질에 교원질이 침착하고 정상 간조직의 변형이 일어난다. 만성 간질환 환자들에서 각종 원인에 의해 간세포의 손상이 발생하면 간조직내 여러 세포들에서 사이토카인들이 분비되고 또한 유리잔기들이 발생하여 간 실질 내에 세포외기질의 침착을 일으킨다. 이러한 간섬유화 초기 단계는 가역적이지만 이과정이 지속되면 간조직내에 비가역적으로 교원질이 침착하

· 교신저자: 김영철 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120
E-mail: yckim@khmc.or.kr

고 재생 결절을 동반하여 궁극적으로 간경변증을 초래한다²⁻⁵.

간의 섬유화 생성에 대한 기전 연구는 어느 정도 진전되었음에도 불구하고 간경변증 치료에 대한 뚜렷한 약물요법이 제시되지 못하고 있고, 지금까지 알려진 항섬유화 효능을 보이는 약물들도 그 작용이 미미하며 간성상세포의 활성화에 대한 특이적인 억제작용은 없는 것으로 보고되고 있다^{6,7}.

최근 한약의 간섬유화에 미치는 영향에 대한 연구는 활발히 진행 중이다. 當歸는 補血·和血·潤燥의 要藥으로^{8,9}, 간질환과 관련된 실험적 연구로는 윤¹⁰ 등은 當歸 수침액의 흰쥐에 대한 간보호효과를, 차¹¹ 등은 알코올 산화 증가, 혈중 지질 강하 및 간기능 개선 효과를, 정¹² 등은 當歸 엑스의 약물성 간장중독에 대한 보호효과를, 박¹³ 등이 간문, 기문혈에 대한 當歸 약침 시술의 약물성 간손상에 대한 보호작용 등을 보고한 바 있다. 그러나 當歸가 간섬유화에 미치는 영향에 대한 실험적 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 當歸가 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향을 관찰하고자, MTT Assay와 BrdU Assay를 시행하여 간성상세포의 활성화도와 증식을 살펴보고, collagen의 합성량, 단백질 합성에 직접 관련이 있는 mRNA의 발현량 및 IL-6 cytokine의 생성량을 관찰하였으며, 물추출물 및 에탄올 80% 추출물의 효과를 비교하여 약제 추출 방법의 차이에 의한 치료 효과의 차이를 검증하고자 하였다.

II. 方 法

1. 재 료

1) 약 제

본 실험에 사용한 약제는 국내산으로 대한약전의 한약규격집에 근거하여 경희의료원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였다.

Table 1.

Herb	Scientific name	Volume(g)
當歸(Daggui)	<i>Angelica Sinens Radix</i>	100

2) 검액의 조제

當歸 100g씩을 환류추출기에 넣고 1000cc의 증류수 또는 80% EtOH를 더하여 관류냉각장치를 부착한 상태로 2시간씩 전탕하였다. 이 전탕액을 Whatmann Paper로 여과한 후 rotary evaporator로 감압농축하고 동결 건조하여 23g(증류수 추출) 및 20g(80% EtOH 추출)씩의 건조추출물을 얻어서 실험에 사용하였다. 이렇게 얻은 약제는 세포배양액에 10 mg/ml의 농도로 녹이고 0.22 μ m syringe filter를 이용하여 멸균한 다음 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

3) 시 약

FBS, DMEM, Antibiotics 등은 Gibco사(CA, USA), n-propanol, MTT 등은 Sigma사(MO, USA), BrdU Kit은 Roche사(Germany), Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit는 TaKaRa사(Japan), RNeasy Mini Plus Kit는 Qiagen사(CA, USA), Top DNA polymerase는 Bioneer사(Korea), RT System은 Promega사(WI, USA), IL-6 Kit은 Peprotech사(London, UK) 등의 제품을 사용하였고, 기타 plastic wares는 SPL사(Korea) 제품을 이용하였다.

2. 방 법

1) Cell line

쥐의 간성상세포인 HSC-T6(kind gift of Dr. Scott L. Friedman)을 이용하였다. 세포는 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamine이 포함된 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

2) 약제처리

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

3) 세포활성 측정(MTT Assay)

MTT Assay를 통해 간성상세포의 활성도를 알아보기 위해 1ml의 DMEM에 2mg의 MTT 비율로 용액을 만들고 적절히 희석시키기 위해서 온도를 따뜻하게 하였다. 24well plate에 HSC-T6 cell을 4×10⁴/ml의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양한

후 약제를 처리하고 각각 23시간, 47시간 후 각 well에 200 μ l의 MTT 용액을 첨가하여 45분 동안 37 $^{\circ}$ C의 온도에 배양하였다. 배지를 제거하고 각 well에 100 μ l의 n-propanol을 첨가한 후 5-10분간 흔들어서 주었다. 각 well에서 용액을 50 μ l 추출하여 96-well plate로 옮긴 후 ELISA Reader로 570nm에서 읽었다.

4) 세포증식능력 측정(BrdU Assay)

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

96-well plate에 세포를 분주하고 24시간 후 다양한 농도의 약제가 포함된 배지에서 각각 20시간, 44시간 동안 추가로 배양하였다. 10 μ l BrdU labeling solution을 각 well에 첨가하고 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C에 배양하였다. 배양액을 제거하고 250 μ l wash medium으로 세포를 씻은 후 200 μ l pre-cooled fixative로 세포를 -15에서 -25 $^{\circ}$ C의 환경에서 30분간 고정시켰다. Fixative를 제거하고 250 μ l wash medium으로 세포를 3회 씻었고 100 μ l nucleases working solution을 첨가하여 30분간 37 $^{\circ}$ C의 환경에서 배양하였다.

이후 Nucleases working solution을 제거하고 250 μ l wash medium으로 세포를 3회 씻은 후 각 well 별로 100 μ l의 anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution을 추가하고 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. Antibody conjugate를 제거하고 250 μ l washing buffer로 세포를 3회 씻은 후 100 μ l peroxidase substrate를 추가하였다. 반응 양성 샘플들이 초록빛을 나타낼 때까지 실온에서 샘플들을 배양하였다(20-30분).

대략 490nm의 참조 파장으로 설정하고 405nm의 파장에서 microplate reader로 샘플들의 흡광도를 측정하였다.

5) RT-PCR

(1) RNA 추출

처리할 약제의 농도별로 6-well plate의 3개 well에 HSC-T6 cell을 8 \times 10⁴/well의 농도로 분주하고 다음날 농도별로 약제를 처리한 후 24시간 및 48시간 후에 Qiagen사의 RNeasy Mini Plus Kit를 이용하여 RNA를 분리하였다.

(2) Complementary DNA(cDNA) 합성

Promega사의 Reverse Transcription System을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

즉, MgCl₂(25mM) 4 μ l, 10X RT buffer 2 μ l, dNTP (10mM) 2 μ l, Random primer 1 μ l(0.5 μ g), Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ l, AMV RT 0.6 μ l (15u), target RNA 1 μ g을 넣고 나머지는 DEPC water를 첨가하여 총 용량이 20.1 μ l가 되게 하여 25 $^{\circ}$ C 10분, 42 $^{\circ}$ C 1시간, 95 $^{\circ}$ C 5분 동안 처리하여 cDNA를 제작하고 5 $^{\circ}$ C에서 차게 해서 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였으며 필요할 때마다 사용하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로는 GAPDH를 사용하였고, target gene으로는 Alpha Smooth Muscle Actin (ASMA), TIMP1, TIMP2, procollagen Type 1a2의 gene을 사용하였으며 각 primer의 sequence는 다음과 같다.

Table 2. Oligonucleotide Primers Used for Quantitative RT-PCR Analysis

Gene	Primer	Sequence	Cycle No.	product size
ASMA	sence	5'- GTC GGG ACC TCA CTG ACT ACC -3'	26	126
	antisence	5'- CAA AAT CCA GGG CGA CAT AAC ACA G -3'		
TIMP1	sence	5'- GCC TAC ACC CCA GCC AT -3'	28	138
	antisence	5'- ATG CCA GGG AAC CAG GAA GC -3'		
TIMP2	sence	5'- GGC AAC CCC ATC AAG AGG ATT CAA -3'	32	107
	antisence	5'- CAC ACT GCT GAG GAG GGG -3'		
col 1a2	sence	5'- TGA GCC TGG TGA GCC CG -3'	30	113
	antisence	5'- TCT CGC CAG GTC TTC CAG -3'		
GAPDH	sence	5'- GGC ATC GTG GAA GGG CTC AT -3'	21	120
	antisence	5'- AGG GAT GAT GTT CTG GGC TGC -3'		

All sequences are listed 5' to 3'

(4) PCR

Bioneer사의 Top DNA Polymerase Kit을 사용하여 수행하였다.

즉, 10X buffer 5 μ l, dNTP 4 μ l, primers FWD, REV 각 20 pmoles, ddH₂O 35.8 μ l, Taq Polymerase 0.2 μ l, cDNA 1 μ l를 넣어 총 volume이 50 μ l가 되게 하여 PCR을 수행하였다. 첫 번째 cycle에서는 95 $^{\circ}$ C 5분, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 하였고, 이후 19-28cycles는 95 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분으로 하였으며, 마지막 cycle은 95 $^{\circ}$ C 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 10분으로 하였다. 이렇게 하여 생긴 생산물은 2% agarose gel을 이용하여 전기영동(110 Volt, 20분간)한 후 densitometer를 이용하여 각 밴드의 밝기를 정량화하였다.

6) Procollagen Type 1 C-Peptide EIA

Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit을 사용하였으며, 제작사의 지시에 따라서 측정하였다.

PIP EIA Kit는 샌드위치 공법을 기반으로 한 solid phase EIA로 2개의 mouse monoclonal anti-PIP antibody를 이용하여 한 단계 절차로 PIP를 검출할 수 있다. Monoclonal antibody 중 하나는 microtiter-plate에 미리 석워졌고, non-specific binding에 대해서 차단되게 하였다. 샘플들, 표준단백질, 그리고 peroxidase(POD)-labeled anti PIP antibody 들은 동시에 plate well에 첨가가 되었고 배양이 되었다. 배양 중에 PIP는 한쪽편에서는 anti-PIP (solid상태)에 결합이 되었고 다른 한쪽 편에서는 POD-anti-PIP에 표지되었다. POD와 기질(H₂O₂와 tetramethyl benzidine)간의 반응은 색깔의 변화로 나타나고 이색깔의 변화정도는 샘플과 표준에 있는 PIP의 양과 비례하게 된다. PIP의 양은 EIA plate reader를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 수치화할 수 있다. PIP의 정확한 샘플 농도는 그 특정 흡광도를 표준 커브에 찍힌 표준흡광도와 비교함으로써 얻을 수 있었다.

7) IL-6 ELISA

Peprtech사의 IL-6 ELISA kit을 사용하여 제작

사의 지시에 따라 수행하였다.

(1) Kit 재구성과 보관법

제작사의 지시에 따라 Capture antibody, Detection antibody, Murine IL-6 standard, Avidin-HRP Conjugate를 만들었다.

(2) Plate 준비

Capture antibody를 PBS(10x PBS를 1x PBS로 희석)에 2 μ g/ml 농도로 희석시킨 다음, ELISA plate well에 100 μ l씩 첨가하였다. Plate를 봉인하고 실온에서 1일간 배양한 후, 각 well을 suction하여 액체를 제거하고 washing buffer(0.05% Tween-20 in PBS) 300 μ l로 4회 세척하였다. 마지막 세척 후 남아 있는 buffer를 제거한 다음, 각 well에 block buffer 300 μ l를 넣고 실온에서 1시간 이상 배양하였으며, suction 후 다시 4번 세척하였다.

(3) ELISA protocol

Standard를 희석액에 4ng/ml에서 희석한 후, Standard 또는 sample 100 μ l씩을 3중으로 plate에 넣고 실온에서 2시간 이상 배양하였다. Plate를 suction한 후 4회 세척한 다음, Detection antibody를 Diluent(0.05% Tween-20 in PBS, 0.1% BSA in PBS)에 0.5 μ g/ml로 희석시키고, 각 Well에 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 이상 배양하였다. Plate를 suction하고 4회 세척한 후, Avidin-HRP Conjugate 5.5 μ l를 diluent에 1:2000 비율로 희석시키고 총량은 11ml로 맞춘 다음, 각 well에 100 μ l씩 넣고 실온에서 30분간 배양하였다. 다시 Suction 후 4회 세척한 후, Substrate solution을 100 μ l씩 각 well에 넣고 색이 발현될 때까지 실온에 배양한 다음, 발색되는 것을 확인 후 405nm 파장에서 ELISA reader에서 읽고 650nm에서 보정하였다.

8) 통계처리

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

III. 結果

1. 當歸가 간성상세포의 활성에 미치는 영향(MTT Assay)

24시간 동안 처리한 當歸의 증류수 추출물에서는 125 μ g/ml부터 유의성 있는 세포활성도의 증가 경향이 나타났으며, 80% EtOH 추출물에서는 모든 농도에서는 대조군과 비교하여 거의 변화가 없었다. 한편 48시간에서는 증류수 추출물의 경우 250 μ g부터 세포활성도가 증가하는 경향을 보였으며, 80% EtOH 추출물에서도 500 μ g/ml에서 세포활성도가 유의성 있는 증가가 인정되었다(Fig. 1, Fig. 2).

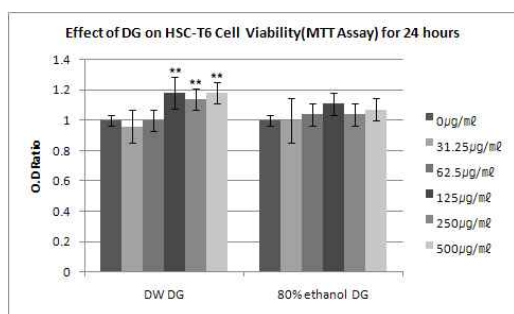


Fig. 1. Effect of DG on HSC-T6 Cell Viability(MTT Assay) for 24hours.

Results show that stellate cell viability was increased by DW and 80% ethanol DG.(P values compared with the none treated. ** : P<0.01)

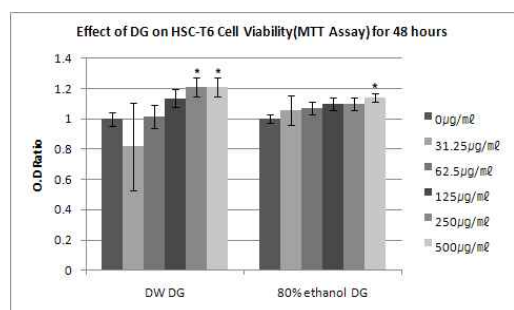


Fig. 2. Effect of DG on HSC-T6 Cell Viability(MTT Assay) for 48hours.

Results show that both DW DG and 80% ethanol DG activate stellate cell viability in 48 hours.(P values compared with the none treated. * : P<0.05, ** : P<0.01)

2. 當歸가 간성상세포의 증식에 미치는 영향(BrdU Assay)

24시간 동안 처리한 當歸의 증류수 추출물에서는 62.5 μ g/ml부터 모두 일정수준의 유의성 있는 세포 증식 억제 경향이 나타났으며, 80% EtOH 추출물에서는 각각 62.5 μ g/ml, 250 μ g/ml에서 유의성 있게 세포증식을 억제하였다. 한편 48시간에서는 증류수 추출물의 경우 125 μ g/ml에서만 유의성 있는 감소를 보였지만 특별한 경향성은 없었고, 80% EtOH 추출물에서는 각각 62.5 μ g/ml, 125 μ g/ml, 500 μ g/ml에서 유의성 있게 세포 활성도가 감소하였다. 증류수 추출물과 80% EtOH 추출물 모두에서 일정농도 이상에서 유의성 있는 억제 효과가 나타났으며, 특히 48시간의 경우, 증류수 추출물에 비해 80% EtOH 추출물에서 더욱 유의한 세포증식 억제를 보이는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3 Fig. 4).

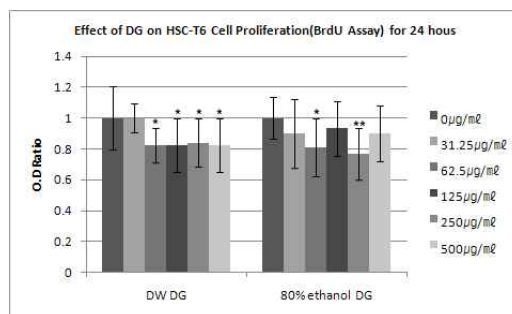


Fig. 3. Effect of DG on HSC-T6 Cell Proliferation (BrdU Assay) for 24hours.

DW DG has inhibitory effect on stellate cell proliferation by 62.5 μ g/ml dose and above. 80% ethanol DG also shows inhibitory effect by 62.5 μ g/ml and 250 μ g/ml.(P values compared with the none treated. * : P<0.05, ** : P<0.01)

當歸가 간성상세포의 섬유화 기전 억제에 미치는 영향

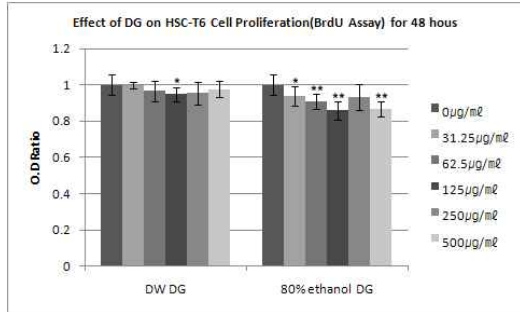


Fig. 4. Effect of DG on HSC-T6 Cell Proliferation (BrdU Assay) for 48hours.

DW DG and 80% ethanol DG have inhibitory effect on stellate cell proliferation. 80% ethanol DG shows stronger effect than DW DG.(P values compared with the none treated. * : P<0.05, ** : P<0.01)

3. 當歸가 간섬유화 관련 유전자 발현에 미치는 영향(RT-PCR)

當歸가 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. 24시간에서는 모두 특별한 경향성을 발견할 수 없었고, 48시간의 경우는 ASMA, TIMP2, collagen type 1a2에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현이 감소되는 경향이 있었다(Fig. 5-a Fig. 5-b Fig. 5-c).

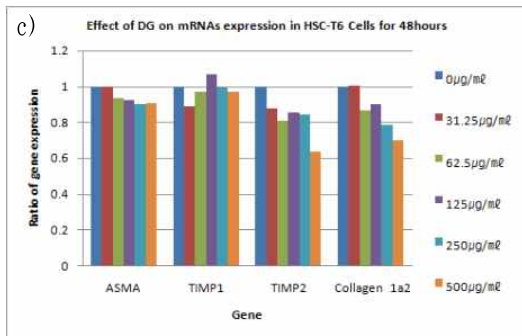
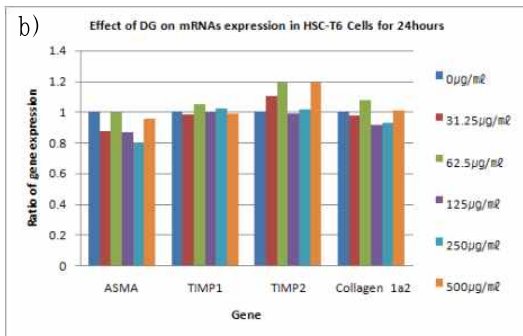
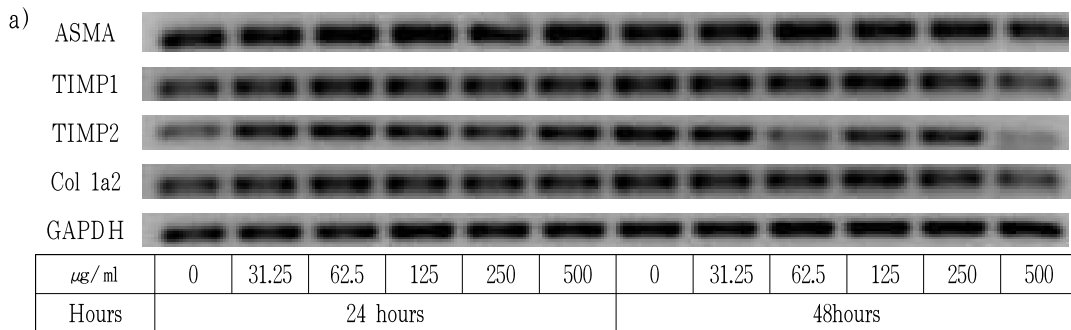


Fig. 5. ASMA, TIMP2 and collagen 1a2 gene expression shows decreased tendency by DG in dose dependent manner.

- a) PCR bands after treatment with different time and doses.
- b) Effect of DG on mRNAs expression in HSC-T6 Cells for 24hours
- c) Effect of DG on mRNAs expression in HSC-T6 Cells for 48hours.

4. 當歸가 procollagen 단백질 합성에 미치는 영향
 24, 48시간 동안 약제를 처리한 후 나타난 결과, 모두 농도 의존적인 감소 경향성을 나타냈으며, 특히 24시간 처리군의 경우 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도에서 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 6).

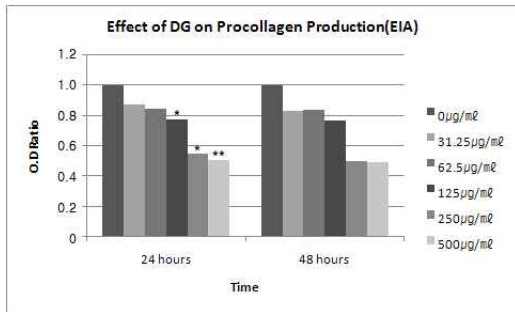


Fig. 6. Effect of DG on Procollagen Production(EIA).

Results show that DG has inhibitory effect on procollagen production in dose dependent manner. (P values compared with the none treated. * : P<0.05, ** : P<0.01)

5. 當歸가 IL-6 cytokine 생성량에 미치는 효과

24, 48시간 동안 약제를 처리한 후 나타난 결과 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향성을 보여주었으며, 특히 고농도(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 유의성 있는 결과가 관찰되었다(Fig. 7).

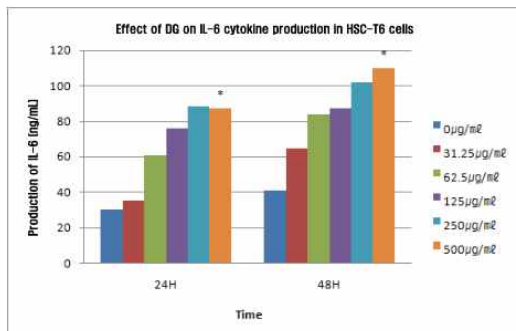


Fig. 7. IL-6 Effect of DG on IL-6 cytokine production in HSC-T6 Cells.

Results of both 24 and 48 hours show that DG activates IL-6 production in dose dependent manner.

IV. 考 察

간경변증(liver cirrhosis)은 여러 가지 만성 간질환의 말기 병변으로서 원인과 형태가 다양하다. 세계 보건기구는 간경변증을 지속적이고 미만성 간 실질 손상, 섬유조직 증식 및 간세포 재생에 의한 결절 형성으로 정의하고 있다¹⁴⁻¹⁵. 간경변은 만성 간질환의 말기 상태로 과다한 알코올의 섭취, 바이러스성 간염, 약물과 독소, 혈관성, 자가 면역성, 그리고 대사성 질환들이 관여하며, 때로는 원인을 찾을 수 없는 경우도 있다¹⁶.

간섬유화(liver fibrosis)는 간경화의 전 단계로서 extracellular matrix protein(EMP), 특히 콜라겐의 과도한 축적으로 발생된다. 간이 손상되면, 지방과 ratinoid 저장 세포라 불리는 활성화된 stellate cell에서 세포외부 매개 단백질이 합성된다. 이 세포의 활성화는 glutathione(GSH)의 고갈에 의한 해독작용의 실패 또는 cytochrome P450(CYP)의 발현 및 Kuffer cell과 염증반응으로부터 유입된 면역세포에 의해 nitric oxide(NO), superoxide anion (O^{2-}), peroxynitrite와 같은 자유 유리기(free radical)에 의해 간세포의 손상을 초래함은 물론, 여러 가지 cytokine 및 chemokine의 작용에 의해서 일어난다¹⁷.

當歸는 기혈로 하여금 각각 돌아가는 바가 있게 하므로 명명되었다¹⁹. 補血, 潤燥, 滑腸의 要藥으로서 실험적으로는 혈중지질강하, 간기능개선, 간보호효과등이 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 當歸가 간섬유화 억제에도 일정부분 효과가 있을 것으로 기대되어 실험에 착수하였다.

한약재를 동결건조하고 다시 배지에 녹여서 세포에 처리할 때 약제별로 나타나는 세포독성은 약제에 따라 다양한 차이를 보이므로 세포독성은 나타나지 않으면서 약 효과를 관찰할 수 있는 농도

의 설정이 중요하다. 지금까지 각종 논문에 소개된 일반적인 한약재의 농도는 일반적으로 500 μ g/ml 이하로 설정되어 이용되어 온 것을 참고로 하여 본 연구에서는 31.25 μ g/ml, 62.5 μ g/ml, 125 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml로 결정하고 시간별로 처리하였다.

간성상세포에 當歸를 처리하였을 때 활성도를 살펴보기 위하여 MTT assay 를 시행하였다. 當歸를 증류수 및 80% EtOH로 각각 추출하여 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였고, 약재의 처리는 24시간, 48시간 동안 하였다. 當歸의 증류수 추출물에서는 24시간 및 48시간 동안 처리한 고농도 투여군에서 세포활성의 증가가 인정되었으며, 80% EtOH 추출물 처리군에서는 48시간 동안 처리한 고농도 투여군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다(Fig. 1, Fig. 2).

따라서 當歸의 증류수 추출물은 간성상세포 활성을 오히려 증가시키며, 세포 생존율을 촉진하는 작용이 있음을 짐작할 수 있었다. 이러한 결과는 이 등의 當歸가 CoCl_2 로 유발된 저산소증에 의한 상세포의 생존율을 향상시키고 세포막의 파괴를 억제하였다는 보고²⁰와 유사한 것이다.

當歸를 처리했을 때 간성상세포의 증식에 미치는 효과를 확인해 보기 위해 BrdU assay를 시행하였다. 증류수 추출물과 80% EtOH 추출물 모두에서 일정 농도 이상에서 유의성 있는 억제 효과가 나타났으며, 특히 48시간의 경우, 증류수 추출물에 비해 80% EtOH 추출물에서 더욱 유의한 세포증식 억제를 보이는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, Fig. 4).

MTT assay 결과와 비교하여 살펴보면, 80% EtOH 추출물에서는 간성상세포 활성도에 별다른 영향을 미치지 못하였으나 BrdU assay 결과는 증류수 추출물에 비해 더욱 유의성 있는 활성도 억제 반응이 나타났다.

다음으로는 當歸가 간성상세포의 collagen 합성에 미치는 영향을 유전자의 변화양상을 통하여 파악하여 보고자 상세포의 활성시에 증가하는 것

으로 알려진 ASMA, 간섬유화에서 기존의 콜라겐 골격을 이루고 있는 collagen type VI 분해하는 물질인 MMP를 억제하는 것으로 알려진 TIMP1와 TIMP2, 간손상시 늘어나는 콜라겐 중의 하나인 procollagen Type 1a2 gene의 변화양상을 살펴보았다. House keeping gene으로는 GAPDH를 선택하였다. 실험결과 24시간에서는 모두 특별한 경향성을 발견할 수 없었고, 48시간의 경우는 ASMA, TIMP2, Collagen1a2에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 유전자 발현이 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-a, Fig. 5-b, Fig. 5-c).

이러한 결과로부터 當歸가 간성상세포의 활성화에 관여하는 일부 유전자에 대한 억제 작용이 있음을 알 수가 있었다.

Procollagen assay의 condition을 만들기 위해서 간성상세포를 5×10^4 /well로 24 well plate에 seeding한 후, 24시간이 경과한 후에 간성상세포가 만들어내는 procollagen의 양을 측정하기 위하여 procollagen type I C-peptide EIA Kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였으며, 제작사의 지시를 따라서 측정하였다. 24, 48시간 동안 약제를 처리한 후 나타난 결과, 모두 농도 의존적인 감소 경향성을 나타냈으며, 특히 24시간 처리군의 경우 고농도에서 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 6). 이러한 결과로부터 當歸는 간성상세포의 procollagen 합성을 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

當歸가 간섬유화 발생에 중요한 역할을 한다고 알려진 염증성 매개 물질중의 하나인 IL-6 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 Peprotech사의 IL-6 kit을 사용하여 제작사의 지시를 따라 ELISA법으로 정량하였다. 24, 48시간 동안 약제를 처리한 후 나타난 결과, 농도 의존적으로 측정치의 증가를 보였으며 특히 고농도에서 유의한 증가를 보였다(Fig. 7).

IL-6는 비만세포에서 생성되는 다면 발현성 염증 사이토카인으로 T세포의 활성을 증가시켜, IgE의 생산을 유도함으로써 만성염증반응을 초래하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 결과는 當歸가 오히

려 간세포의 염증반응을 증가시켜서 간섬유화를 촉진하였다고 볼 수도 있다.

그러나 최근 Herruzo^{21,22} 등이 랫드와 토끼를 이용한 실험을 통해 IL-6가 관련 유전자 발현을 촉진하여 MMP-13 생성을 증가시켰으며 IL-6 농도 및 시간 의존적으로 MMP-13의 생성도 증가했으므로, in-vitro에서는 IL-6가 간섬유화를 유발하는 것이 아니라 억제한다는 보고를 참고하여 볼 때, 본 연구에서 當歸가 IL-6 생성량을 시간 및 농도 의존적으로 증가시킨 것은 IL-6의 분비를 촉진하여 일련의 단백질분해효소(Matrix Metallo Proteinase)의 증가를 통해 기질의 분해시킴으로써 간섬유화 억제 효과를 나타낸 것으로 추측해 볼 수 있다.

즉, 이러한 실험결과들을 미루어볼 때, 當歸가 간성상세포의 세포사멸을 억제하면서도 ASMA, TIMP2, Collagen 1a2 유전자 발현과 procollagen 합성을 감소시키고, IL-6의 분비를 촉진하여 기질을 분해시킴으로써 간섬유화를 억제하는 효과가 있을 것이라고 판단된다.

V. 結 論

當歸가 간성상세포의 세포활성과 증식능, collagen 합성 및 그 유전자 발현, Cytokine IL-6 생성에 미치는 영향을 관찰하고자 rat의 간성상세포에 약물을 처리한 후 MTT assay, BrdU assay, Procollagen assay, RT-PCR 및 Cytokine IL-6 발현량 측정을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 當歸는 증류수 추출물에서는 간성상세포 활성을 오히려 유의하게 증가시켰으며, 80% EtOH 추출물은 별다른 영향을 미치지 못했다.
2. 當歸는 간성상세포의 증식을 증류수 추출물에서는 24시간까지만 유의성있게 억제하였고, 48시간에서는 특별한 경향성이 없었으며, 80% EtOH 추출물은 24시간 및 48시간에서 모두 유의성 있게 억제하였으며 특히 48시간에서 더 많은 억제

반응을 나타냈다.

3. 當歸는 48시간에서 ASMA, TIMP2, Collagen 1a2 유전자 발현을 감소시키는 경향성이 있었다.
4. 當歸는 간성상세포의 procollagen 합성 억제에 대한 영향에 대한 실험에서 24, 48시간 모두 농도 의존적인 감소 경향성을 나타냈다.
5. 當歸는 IL-6 생성을 24시간 및 48시간에서 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈으며, 특히 고농도에서 유의한 증가를 보였다.

이상에서 當歸는 간성상세포의 활성도는 상승시켰으나, 간성상세포의 증식을 부분적으로 억제하였고, TIMP2, Collagen 1a2 유전자 발현과 procollagen 합성을 억제하였으며, IL-6 생성량을 촉진하였다. 향후 當歸가 간섬유화에 미치는 영향에 관한 연구가 지속적으로 필요할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 통계청. 사망원인통계 결과. 2008, p. 7-10.
2. Pietrangelo A. Iron-induced oxidant stress in alcoholic liver fibrogenesis. Alcohol. 2003;30(2):121-9.
3. Wang XZ, Zhang LJ, Li D, Huang YH, Chen ZX, Li B. Effects of transmitters and interleukin-10 on rat hepatic fibrosis induced by CCl4. World J Gastroenterol. 2003;9(3):539-43.
4. Sedlaczek N, Hasilik A, Neuhaus P, Schuppan D, Herbst H. Focal overexpression of insulin-like growth factor 2 by hepatocytes and cholangiocytes in viral liver cirrhosis. Br J Cancer. 2003;88:733-9.
5. Schoedel KE, Tyner VZ, Kim TH, Michalopoulos GK, Mars WM. HGF, MET, and matrix-related proteases in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar variant, cirrhotic and normal liver. Mod Pathol. 2003;16:14-21.
6. Poynard T, Ratziu V et al. Fibrosis in patients

- with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20:47-55.
7. Mathurin P, Duchatel V et al. Survival and prognostic factors in patients with severe hepatitis treated with prednisolone. *Gastroenerology.* 1995;110:1847-53.
 8. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. *임상본초학.* 서울: 영림사; 1995, p. 578-80.
 9. 이시진. *본초강목.* 북경: 인민위생출판사; 1982, p. 833-7.
 10. 윤수홍, 이분희. 당귀 수침액이 흰쥐 간기능 장애에 미치는 영향. *한국위생과학회지.* 2003;9(2):77-87.
 11. 차연수, 최동성, 오석홍. 당귀의 첨가 식이가 흰쥐의 지방대사와 알콜대사 및 간기능에 미치는 영향. *한국응용생명화학회지.* 1998;42(1):29-33.
 12. 정명훈, 오형수, 임종훈. 한국당귀(*Angelicae gigantis Radix*) 엑스가 흰쥐의 약물성 간장해에 대한 보호 효과. *생약학회지.* 1998;29(4):402-12.
 13. 박경미, 문진영, 안준철, 최미정, 남경수, 임중국. *한의학대연구소 논문집.* 1996;5(1):1-13.
 14. Poynard T, Ratzu V et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20:47-55.
 15. Mathurin P, Ducatel V et al. Survival and prognostic factors in patients with severe hepatitis treated with prednisolone. *Gastroenterology.* 1995;110:1847-53.
 16. 대한가정의학회. *가정의학(임상편).* 서울: 계축문화사; 2002, p. 921-6, 993-8.
 17. 장선일, 김형진, 황기명, 권태오, 제갈승주, 김윤철, 배현옥, 최병민, 심재석, 곽준수, 정헌택, 윤용갑. 인진슬기의 간섬유화 억제 효과. *대한한의학방제학회지.* 2002;10(2):225-41.
 18. 이동현. 흰 쥐 간 정상(이토)세포의 내향성 포타습 전류 특성 및 배양에 따른 변화. *연세대학교 대학원;* 2006, p. 7-8.
 19. 서부일, 변성희. *국역본초비요.* 일중사; 2003, p. 211-5.
 20. 이승희, 문성진, 신진봉, 허래경, 성기문, 양재훈, 송봉근. 당귀가 저산소로 손상된 정상세포의 gliosis억제에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 2008;29(1):167-78.
 21. Solis-Herruzo JA, Rippe RA, Schrum LW, de La Torre P, Garcia I, Jeffrey JJ, Munoz-Yague T, Brenner DA. Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription factor in cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 1999;274(43):30919-26.
 22. J. A. Solis Herruzo, P. de la Torre, T. Diaz Sanjuan, I. Garcia Ruiz and T. Munoz Yague. IL-6 and extracellular matrix remodelling. *Rev Esp Enferm Dig.* 2005;97(8):575-95.