

YBR의 肝纖維化 억제 效果에 관한 研究

승현석, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Inhibitory Effect of YBR on Hepatic Fibrogenesis

Hyun-seok Seung, Hong-jung Woo

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

ABSTRACT

Objective : This study was performed to investigate the anti-fibrogenic effect and changes of inflammation-related genes by YBR I and YBR II (YBR I: *Arteisiae Capillaris Herba*, *Atractylodis Rhizoma Alba*, *Hoelen*/ YBR II: YBR I + *Sanguisorbae Radix*, *Biotae Cacumen*, *Cirsii Japonici Herba*) on HSC(hepatic stellate cells)-T6 and TAA-induced rat liver tissue.

Materials and Methods : HSC-T6 were treated with various concentrations of distilled-water extract YBR I and YBR II extract for 24, 48 and 72 hours. After the treatment, cell viability, proliferation, procollagen levels and IL-6 levels were measured by using MTT Assay, BrdU Assay, Procollagen Type 1 C-peptide EIA kit, and Murine IL-6 ELISA Development kit. Rat liver fibrosis was induced by intraperitoneal TAA injection of 150mg/kg 3 times a week for 6 weeks. After the treatment, body weight, liver & spleen weights, liver function test, complete blood cell count and change of portal pressure were studied. In addition, gene expressions of ASMA, IL-6, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2, all of which are known to be associated with liver fibrosis, were analyzed by using Real-Time PCR. After YBR I and YBR II treatment, percentages of collagen in TAA-induced rat liver tissue were measured.

Results : The viability and proliferation of the HSC-T6 decreased as the concentration increased. The production of procollagen decreased as the concentration increased. The production of IL-6 was little influenced by YBR I and YBR II. There was no difference in rat body weight between the TAA-only group and the YBR groups. Compared with rat liver weight of TAA-only group, that of the YBR groups increased. In the YBR I group, the serum level of AST elevated by TAA injection significantly decreased and in the YBR I and II group, the serum level of ALP and ALT elevated by TAA injection decreased. In the YBR I group, white blood cell count elevated by TAA injection decreased but platelets increased. In the YBR I group, the portal pressure elevated by TAA injection significantly decreased. Decreases in the gene expression of ASMA and MMP-2 were observed in the YBR I group. The gene expression of IL-6 was little influenced by YBR I and YBR II-treated groups.

In the histological finding, TAA injections caused severe fibrosis, but YBR I and YBR II treatment significantly reduced the amounts of hepatic collagens.

Conclusions : These results suggest that YBR I and II have inhibitory effects on the hepatic fibrogenesis.

Key words : *Arteisiae Capillaris Herba*, TAA, Hepatic Stellate Cell

1. 서론

간섬유화 및 간경변증은 각종 바이러스성, 알콜성, 중독성, 자가면역성 등의 원인으로 만성 간염이 치유되지 않고 지속적으로 악화하는 경우에 진행되며 간부전으로 인한 사망에 이르게 심각한 만성 간질환의 한 형태이다.

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

2008년 통계청 발표 국내 사망원인통계에 의하면 간질환은 전체 질환별 사망원인 중 6위에 해당하며, 특히 40-50대 남성에서의 사망이 각각 2-3위를 차지하고 있어서 많은 관심의 대상이 되고 있다¹.

임상적으로는 만성 간염에서 간경변증으로 진행하는 것을 막는 것이 중요한데, 질환의 예후에 영향을 미치는 합병증과 암 발생이 간경변증으로 진행된 이후에 발생하기 때문에 바이러스 간염을 포함한 모든 만성 간질환자의 치료목표가 되고 있다. 즉 간경변증을 유발하는 모든 질환을 해결하는 가장 기본적인 단계는 간섬유화 과정을 이해하고 연구하는 것이다². 현재 간경변증과 관련하여 간섬유화의 기전 및 각종 화합물의 치료효과에 대한 연구는 세계적으로도 활발하게 진행되고 있으나³⁻⁶, 아직까지 임상에 직접 적용하여 효과를 기대하기에는 충분치 못한 상황이다.

한약제에 의한 간섬유화 억제효과에 대한 연구는 주로 염증반응을 차단하는 효과에 대한 검증과 섬유화 과정에서 가장 중요한 역할을 하는 간성상세포와 collagen의 합성과 용해와의 관계에 대한 실험적 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 현재까지 만성 간질환의 한의학 임상에서 빈용되는 인진청간탕⁷ 및 단미제로서 인진⁸, 단삼⁹ 등이 Procollagen 합성 억제¹⁰, 간섬유화 관련 유전자 발현을 조절을 통하여 간섬유화를 억제하고 간세포를 보호하는 효과¹¹가 있음이 보고되고 있다. 하지만 처방의 단순화 및 효율의 극대화에 대한 연구의 필요성은 계속 요구되고 있다.

이에 저자는 단순화시킨 한약처방이 간섬유화 및 그 기전에 미치는 영향을 관찰하고자 간성상세포주를 이용한 세포실험에서는 세포활성도, 세포증식능, procollagen 합성, IL-6(Interleukin-6) 발현 등을 측정하였다. 또 형태적으로 사람의 간경변과 가장 유사한 TAA(Thioacetamide) 유도 간섬유화 모델 흰쥐에 대하여 간기능검사, 일반혈액검사, 문맥압 측정, 간장에서의 섬유화와 관련된 유전자 발

현 정도 및 병리조직검사 등을 수행하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 세포 실험

1) 재 료

본 실험에 사용한 약제는 경희대 부속 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며 내용 및 용량은 Table 1과 같다. (YBR I: Yinjin- Baekchul-Bokryung, YBR II : YBR I + Jiyou-Cheukbaek-Daegue)

Table 1. Prescription of YBR I and YBR II

Herb	Scientific name	I Dose (g)	II Dose (g)
茵 陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	400	400
白 朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	100	100
白茯苓	<i>Hoelen</i>	100	100
地榆炒	<i>Sanguisorbae Radix</i>	•	100
側柏炒	<i>Biotae Cacumen</i>	•	100
大薊炒	<i>Cirsii Japonici Herba</i>	•	100
Total		600	900
Extract (Ratio)		95 (15.8%)	131 (14.6%)

2) 방 법

(1) 약제의 추출

인진, 복령, 백출 1군을 각각 400g, 100g, 100g과 지유초, 측백초, 대계초를 1군에 각각 100g, 100g, 100g씩 더한 2군을 두차례로 나누어 환류추출기(Duksan, Korea)에 넣고, 냉각기를 부착한 상태에서 증류수를 5000ml를 가하여 2시간씩 2회 가열 추출하였다. 추출액을 filter paper로 여과 후, Rotary evaporator(Buchi社RE121, SWISS)로 감압 농축하여 농축액을 얻었다.

(2) 동결건조

이 농축액을 동결건조기(EYELA, Japan)로 건

조하여 YBR I (인진, 복령, 백출) 과 YBR II (인진, 복령, 백출, 지유초, 측백초, 대계초)를 각각 95g, 131g씩 얻었다.

(3) 얻어진 동결건조 엑기스를 다양한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

3) Cell line

쥐의 정상세포인 HSC-T6을 이용하였다. 세포는 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamine 이 포함된 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C로 배양하였다.

4) 약제처리

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

5) 세포 활성 측정

24well plate에 HSC-T6 cell을 4×10⁴ /ml의 농도로 세 그룹으로 분주하고, 약제를 각각 0, 100, 200, 300, 400, 500 ug/ml의 농도로 처리한 후 23시간, 47시간, 71시간 경과 후 각 well에 MTT solution을 첨가하여 추가로 45분 동안 37°C의 온도에서 배양하였다. 그런 다음 배지를 제거하고 각 well에 100 μl의 n-propanol을 첨가한 후 5-10분간 흔들어 주었다. 각 well에서 용액을 50μl씩 추출하여 96-well plate로 옮긴 후 ELISA Reader로 570nm에서 읽었다.

6) 세포 증식 측정

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III(Rocke, UK)를 이용하여 제작사의 지시에 따라 측정하였다. 즉, 96-well plate에 세포를 분주하고 24시간 후 다양한 농도의 약제가 포함된 medium으로 20시간 동안 추가로 배양하였다. BrdU labeling solution을 각 well에 첨가하고 4시간 동안 37°C에 배양하였다. Culture medium을 제거하고 wash medium으로 세포를 2회 씻은 후 pre-cooled fixative로 세포를 -25°C의 환경에서 30분간 고정시켰다. 다시 wash medium으로 세포를 3회 씻은 다음 nucleases working solution을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다.

이후 Nucleases working solution을 제거하고 wash medium으로 세포를 3회 씻은 후 각 well별로 anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution을 추가하고 30분간 37°C에서 배양하였다. 다시 washing buffer로 세포를 3회 씻고 peroxidase substrate를 추가하였다. 반응 양성 샘플들이 녹색을 보일 때까지 실온에서 30분간 배양한 후 약 490nm의 참조 파장에서 405nm의 microplate reader로 샘플들의 흡광도를 측정하였다.

7) Procollagen 합성 측정

Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit(TaKaRa, Shiga, Japan)을 사용하였으며, 제작사의 지시에 따라서 측정하였다.

8) IL-6 생성 측정

Peprotech Inc.의 Murine IL-6 ELISA Development Kit(Peprotech, NJ, USA)을 사용하였으며, 제작사의 지시에 따라 측정하였다.

2. 동물 실험

1) 동물

혈청검사에서 각종 감염이 인정되지 않고, 일 반증상과 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. 동물 실험은 경희의료원 실험동물 윤리위원회의 승인(KHMC-IACUC 2009-21)을 얻고 수행하였다.

2) 실험 설계

실험동물들을 ①정상군(Normal diet without treatment) ②대조군(TAA only) ③YBR I(TAA+인진, 복령, 백출) 투여군, ④YBR II(TAA+인진, 복령, 백출, 지유초, 측백초, 대계초) 투여군의 4군으로 나누고 군 당 6마리씩 배치하였다. TAA는

45mg/ml의 농도로 normal saline에 녹인 후 0.22 um syringe filter로 여과멸균하여 150mg/Kg의 농도로 주 3회 6주간 복강주사하였다. 검액은 1g/Kg의 농도로 실험기간동안 주 5일간 오전 10시경 1회씩 경구투여하였다. 또한 대조군에는 주 5일간 생리식염수를 동량으로 경구투여 하였다.

3) 체중 측정

6주의 실험기간동안 4군의 체중을 주 1회씩 측정하였다.

4) 간과 비장의 중량 측정

6주간의 투약기간이 끝난 후 2일이 경과하여 동물들을 희생하여 간과 비장을 적출한 후 중량을 측정하였다.

5) 간기능검사와 일반혈액검사

동물을 희생하고 혈액을 채취하여 생화학검사 및 일반혈액검사를 시행하였다. 간기능검사는 Beckman Coulter, LX-20을 이용하여 수행하였으며, 검사항목으로는 AST, ALT, Total Bilirubin, Alkaline Phosphatase, GGT 등이었고, 일반혈액검사는 SIEMENS Hematology system ADVIA 120을 이용하여 수행하였으며, 검사항목으로는 WBC, RBC, Hgb, Hct, Platelet 등을 선택하였다.

6) 문맥압 측정

실험동물을 마취제(zoletill)를 0.1cc/kg 농도로 정맥주사하여 마취시킨 후 회복하고 문맥을 찾아 16G catheter를 삽입한 후 문맥압 측정장치에 연결 후 문맥압에 비례하여 상승되는 물기둥의 높이를 측정하였다.

7) Real-Time PCR(실시간 정량적 역전사 증합 효소연쇄반응)

(1) RNA 추출

RNeasy Mini Kit(Qiagen, TX, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였다.

(2) cDNA 합성

Reverse Transcription System(Promega, WI, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로는 GAPDH를 사용하였고, target gene으로는 ASMA, Procollagen Type Ia1, IL-6, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 등의 gene을 사용하였다.

(4) Real-Time PCR(실시간 정량적 역전사 증합효소연쇄반응)

1.5ml 시험관에 2.4 μ l의 25 mM MgCl₂, 2 μ l의 Lightcycler fast start enzyme이 포함된 DNA master SYBR green I, 10pmol의 sense와 antisense 시발체, 증류수를 포함하여 18 μ l로 최종용량을 조정하였다. 18 μ l의 혼합물에 2 μ l의 cDNA를 혼합하여 모세관(capillary tube)에 분주한 다음 뚜껑을 닫고 700g, 5초간 원침한 다음 Lightcycler 증폭기(Applied Science, Mannheim, Germany)에 장착하였다. Annealing 온도는 55 $^{\circ}$ C로서 PCR 생성물의 크기에 따라서 25bp/sec로 하여 real-time PCR을 시행하였다. 그런 다음 각 유전자의 발현정도를 GAPDH와의 상대적인 수치로 계산하였다.

8) 간의 병리조직학적 검사

6주간 TAA injection 및 약제투여 후 마취제(zoletill)를 0.1cc/kg 농도로 정맥주사하여 마취시킨 후 문맥압을 측정한 다음 간장을 적출하여 10% 중성포르말린 용액에 고정한 후 파라핀포매 후 로타리 마이크로톰으로 4um 두께로 조직절편을 제작한 다음 Hematoxylin & Eosin 염색 및 Masson-Trichrome 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였고 iMTechnology 사의 iSolution program을 이용하여 섬유화 정도를 전체 면적에 대한 비율로 표시하였다.

9) 통계학적 분석

정상군과 TAA 투여군 및 각 약물투여군과의 비교를 위한 통계처리는 SPSS 12.0.K을 이용하여 Mann-Whitney U-test를 수행하였으며, p<0.05인 경우를 유의성이 있는 것으로 보았다.

III. 결 과

1. 세포 실험

1) 간성상세포의 활성에 미치는 영향(MTT Assay)
 YBR I군 및 YBR II군이 간성상세포의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 처방군을 증류수로 추출하여 24시간, 48시간, 72시간 별로 0, 100,

200, 300, 400, 500ug/ml 농도로 처리한 결과 유의성 있는 농도의존적 세포 활성도의 감소 경향이 나타났다. 특히 장시간으로 갈수록 세포활성도의 감소가 두드러졌다(Table 2).

Table 2. Effect of YBR I and YBR II on HSC-T6 Cell Viability

	Hour	0ug/ml	100ug/ml	200ug/ml	300ug/ml	400ug/ml	500ug/ml
YBR I	24	0.49±0.00	0.48±0.00	0.47±0.02	0.46±0.03	0.41±0.01*	0.41±0.01*
	48	1.20±0.03	1.26±0.09	1.17±0.04	1.00±0.02*	0.80±0.03*	0.57±0.02*
	72	1.71±0.02	1.48±0.05*	1.40±0.06*	1.24±0.03*	0.80±0.02*	0.39±0.02*
YBR II	24	0.46±0.00	0.47±0.00	0.45±0.02	0.41±0.04*	0.40±0.00*	0.31±0.00*
	48	1.19±0.00	1.17±0.00	1.12±0.00*	0.83±0.00*	0.49±0.00*	0.25±0.00*
	72	1.71±0.10	1.52±0.10	1.41±0.00*	0.97±0.00*	0.28±0.00*	0.10±0.00*

Values represent O.D.(optic density) of each samples.
 Values represent Mean ± S.D.
 * : P<0.05 (P values compared with the none treated)

2) 간성상세포의 증식에 미치는 영향(BrdU Assay)
 YBR I군 및 YBR II군이 간성상세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 처방군을 증류수로 추출하여 24시간 및 48시간 동안 0, 31.25, 62.5,

125, 250ug/ml 농도로 처리한 결과 농도의존적 세포 증식도의 감소 경향이 나타났다. YBR II군의 증식도가 농도가 증가할수록 뚜렷히 감소되었다 (Table 3).

Table 3. Effect of YBR I and YBR II on HSC-T6 Cell Proliferation

	Hour	0ug/ml	31.25ug/ml	62.5ug/ml	125ug/ml	250ug/ml
YBR I	24	1.00	0.99	0.93	0.95	0.91
	48	1.00	1.01	0.96	0.85	0.79
YBR II	24	1.00	0.99	0.99	0.88	0.85
	48	1.00	1.00	0.90	0.62	0.25

Values represent the ratio of O.D.(optic density) compared with the non-treated control(0ug/ml)

3) Procollagen 합성에 미치는 영향
 간성상세포를 5×10⁴/well로 24 well plate에 seeding하였으며 procollagen의 양을 측정하기 위하여 Procollagen Type I C-peptide EIA Kit(TaKaRa, Japan)를 사용하였다.

24시간 및 48시간 동안 약재를 처리한 후 나타난 결과 농도가 높을수록 Procollagen 합성을 억제하는 경향이 나타났다(Table 4).

Table 4. Effect of YBR I and YBR II on Procollagen Synthesis in the HSC-T6 Cells

	Hour	0ug/ml	50ug/ml	200ug/ml
YBR I	24	1.00	0.47	0.33
	48	1.00	0.95	0.29
YBR II	24	1.00	0.93	0.79
	48	1.00	1.01	0.87

Values represent the ratio of produced collagen volume compared with the non-treated control(0ug/ml).

4) IL-6 생성에 미치는 영향

간성상세포를 5×10^4 /well로 24 well plate에 seeding 하였으며 IL-6의 양을 측정하기 위하여 Peprotech Inc.의 Murine IL-6 ELISA Development Kit을 사용하여 측정하였다.

24시간 동안 약제를 처리한 후 나타난 결과 YBR I군에서는 농도가 높을수록 IL-6 합성이 다소 증가하는 경향이 나타났으나 미미했고, YBR II군은 농도에 따른 차이가 별로 없었다(Table 5). 48시간 동안 약제 처리한 후 나타난 결과 YBR I군은 농도에 따른 별 차이가 없었지만 YBR II군은 농도가 높을수록 다소 감소하는 경향이 나타났다(Table 5).

Table 5. Effect of YBR I and YBR II on IL-6 Production of the HSC-T6 Cells(ELISA)

	Hour	0ug/ml	50ug/ml	200ug/ml
YBR I	24	1.00	1.04	1.07
	48	1.00	1.01	1.01
YBR II	24	1.00	1.01	1.00
	48	1.00	0.98	0.96

Values represents the ratio of O.D.(optic density) compared with the non-treated control(0ng/ml)

2. 동물 실험

1) 체중의 변화

정상군, 대조군(TAA 단독투여), YBR I군, YBR II군으로 나누어 6주간 각 군의 실험동물의 중량을 측정하였다(Fig. 1).

그 결과 최초 정상군은 357g, 대조군은 342g, YBR I군은 330g, YBR II군은 331g이었고, 6주후 정상군은 426g, 대조군은 355g, YBR I군은 361g, YBR II군은 339g이었다. 정상군은 체중이 점진적으로 증가하였으며, 대조군과 YBR I군 및 YBR II군의 체중에는 별 차이가 발생하지 않았으나, 세 군 모두 정상군에 비해 체중은 감소하였다.

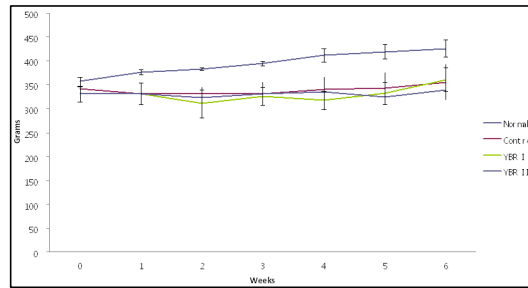


Fig. 1. Changes of Body Weight.

YBR I: Yinjin-Baekchul-Bokryung, YBR II : YBR I + Jiyou-Cheukbaek-Daegue

2) 간과 비장의 중량 측정

정상군, 대조군(TAA), YBR I, YBR II으로 나누어 6주후 간과 비장의 무게를 측정하였다(Table 6).

간의 중량은 정상군에서 12.8g, 대조군에서 16.1g, YBR I군에서 16.8g, YBR II군에서 14.2g 이었다. 대조군 및 YBR I군과 YBR II군에서 모두 정상군에 비하여 간의 중량이 증가하는 경향이 있었다.

비장의 중량은 정상군에서 0.8g, 대조군에서 0.9g 이었고, YBR I군에서 1.0g, YBR II군에서 1.0g 이었다. 정상군에 비하여 대조군 및 YBR I군과 YBR II군에서 증가하는 경향이 있으나 통계적 유의성은 없었다.

3) 간기능검사 소견

(1) TAA 처치가 간기능검사 수치에 미치는 영향
간경변증 유발을 위해 6주간 TAA를 복강주사한 후 간기능검사 수치를 관찰하였다(Table 7).

TAA 투여는 전체적으로 정상군에 비하여 간기능저하 소견을 보여주고 있다.

(2) 두 한약 처방 투여가 간기능검사 수치에 미치는 영향

6주간 각 군별로 처리한 후 각 군간 간기능검사 수치를 관찰하였다(Table 7).

AST는 YBR I군에서 대조군에 비해서 수치가 유의하게 낮아졌으며(p<0.05), YBR II군에서는 대조군에 비하여 낮아지는 경향을 보였다.

ALT는 YBR I군에서 대조군에 비하여 낮아지는 경향을 보였으며, YBR II군에서는 대조군에 비하여 다소 낮아지는 경향을 보였다.

Alp는 YBR II군에서 대조군보다 다소 높아지는 경향이 있으며, GGT는 YBR I군에서 대조군에 비하여 낮아지는 경향을 보였다.

Table 6. Change of the Organ Weight after Herb Medicine Treatment

Group	No	B.W.	Liver weight (g)	L.W./B.W.	Spleen weight (g)	S.W./B.W.
Normal	6	426	12.8±1	0.03	0.8±0	0.002
Control	6	355	16.1±3	0.05	0.9±0	0.003
YBR I	6	361	16.8±3	0.05	1.0±0	0.003
YBR II	6	339	14.2±2	0.04	1.0±0	0.003

values represent mean ± S.D.

L.W.: Liver Weight

L.W./B.W. : Liver Weight / Body Weight

S.W.: Spleen Weight

S.W./B.W. : Spleen Weight / Body Weight

Table 7. Effect of YBR I and YBR II on the Liver Function Test

Group	No	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	Alp(IU/L)	GGT(IU/L)
Normal	6	201±42	115±44	113±14	1.0±1
Control	6	586±478	220±129	373±104	12.8±10
YBR I	6	295±96*	140±37	370±91	9.5±4
YBR II	6	518±313	209±90	382±89	17.5±9

values represent mean ± S.D.

p values compared with the control group

*; p<0.05

4) 일반혈액검사 소견

두 처방이 일반혈액검사에서 미치는 영향을 관찰하기 위하여 6주간 각 군별로 처치를 한 후 일반혈액검사 수치를 관찰하였다(Table 8).

WBC는 대조군, YBR I군은 정상군에 비하여 증가하는 경향을 보였고, YBR II군은 정상군에 비해 유의하게 증가하였다(p<0.05). YBR I군 및 YBR II군은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다.

RBC, Hgb, Hct는 정상군에 비하여 대조군 및 YBR I군, YBR II군에서 감소하는 경향을 보였다.

PLT는 정상군에 비하여 대조군(p<0.05)에서는

유의하게 상승하였고, YBR I군, YBR II군에서는 상승하는 경향을 보였다.

5) 문맥압 측정

문맥압에 미치는 영향을 관찰하기 위해 6주간의 약물투여 후 문맥압을 측정하였다(Table 9). 대조군 및 YBR I군, YBR II군 모두 정상군에 비하여 유의성 있게 문맥압이 상승하였다(p<0.05).

YBR I군에서는 대조군에 비하여 문맥압이 유의성 있게 하강하였다(p<0.05).

YBR II군에서는 YBR I군보다는 상승하였으며, 대조군보다는 다소 높았으나 통계적 유의성은 없었다.

Table 8. Effect of YBR I and YBR II on the Complete Blood Cell Count (CBC)

Group	No	WBC(X10 ³ /ul)	RBC(X10 ⁶ /ul)	Hgb(g/dl)	Hct(%,X10)	PLT(X10 ⁵ /ul)
Normal	6	8.8±2.1	9.7±1.0	17.3±1.0	5.2±0.3	6.8±0.7
Control	6	15.6±4.2	8.7±0.0	15.7±1.0	4.7±0.2	9.5±1.3
YBR I	6	11.7±5.1	8.7±0.0	15.5±0.0	4.6±0.2	7.3±2.2
YBR II	6	14.3±2.0	8.7±1.0	15.4±1.0	4.5±0.3	8.7±1.3

values represent mean ± S.D.

Table 9. Change of Portal Pressure

Group	No	Portal pressure(cmH ₂ O)
Normal	6	8.8±1
Control	6	15.4±1
YBR I	6	12.1±1*
YBR II	6	15.5±3

values represent mean ± S.D.

p values compared with the control group

* ; p<0.05

6) Real-Time PCR(실시간 정량적 역전사 중합 효소연쇄반응)

YBR I군 및 YBR II군이 섬유화 관련 유전인자 ASMA, IL-6, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 Real-Time PCR로 target genes/GAPDH비율을 분석하였다. 정상군 유전자의 발현정도를 1로 두고 간 섬유화 유발군과 약재처리군의 유전자 발현양상을 상대적으로 표시하였다.

결과적으로 TAA 주입으로 증가된 collagen의 합성 관련 유전자의 발현을 억제하여 섬유화 진행을 억제하는 효과가 있었다. TAA군 즉 대조군은 Collagen type Iα1(COLL1), ASMA, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 유전자의 발현을 증가시켰고, IL-6 유전자의 발현을 감소시켰다. YBR I군에서는 대조군에서 상승된 COLL1, ASMA, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 유전자의 발현이 억제되었고, 대조군에서 저하된 IL-6 유전자의 발현은 증가되었다. YBR II군에서는 대조군에서 저하된 IL-6 유전자의 발현은 YBR I군보다 증가되었고, MMP-2 유전자의 발현은 대조군보다 감소하였으며, TIMP-1에서는 대조군보

다 증가하였다(Fig. 2).

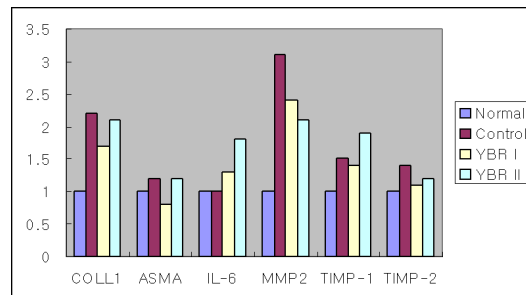


Fig. 2. Effects of YBR I and YBR II on the expressions of fibrosis markers in TAA induced mice liver.

Relative expression level of each genes normalized by GAPDH is set to 1.

YBR I: Yinjin- Baekchul-Bokryung, YBR II : YBR I + Jiyou-Cheukbaek-Daegue

7) 간의 병리조직학적 소견

(1) 6주간의 약물투여후 Hematoxylin & Eosin 염색하여 광학현미경을 이용하여 육안적 관찰하였다.

정상군에서는 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었고, 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포 괴사나 염증반응은 관찰되지 않았다(Fig. 3-A).

대조군(TTA)에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 문맥 주위와 중심정맥 주위로 심한 정도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 심한 간세포 괴사와 이에 동반된 염증반응, 심한 Ballooning도 관찰되었다(Fig. 3-B).

YBR I군에서는 중등도의 간소엽의 입체구조가

부분적으로 소실되었고 문맥주위역, 중심정맥부분 및 기타 간조직에서 중등도의 섬유화가 관찰되었다(Fig. 3-C).

YBR II군에서는 병리조직 소견이 대조군보다 섬유화 정도 및 간세포 괴사 정도가 다소 감소하였다(Fig. 3-D).

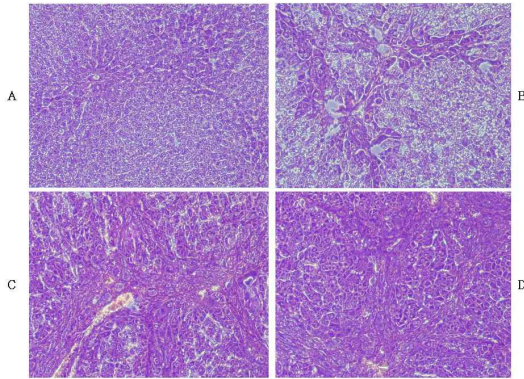


Fig. 3. Histological findings of TAA induced liver damages in SD rats(H&E stain, x200).

A)Normal , B)Control : TAA injection only, C)YBR I, and D) YBR II.

(2) Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였으며, collagen이 차지하는 면적의 비율을 Image analyzer(iSolution, iMTechnology, Canada)를 이용하여 percentage로 표시하였다.

정상군에서는 문맥역에만 소량의 collagen 침착이 관찰되었다(Fig. 4-A).

대조군(TAA)에서는 문맥 주위, 중심정맥 주위로 현저한 collagen 침착이 관찰되었다(Fig. 4-B).

YBR I군에서는 문맥 주위와 중심정맥 주위로 collagen의 침착이 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 4-C).

YBR II군에서는 YBR I군에 비하여 오히려 문맥 주위 및 중심정맥 주위로 collagen 침착이 조금 심하게 나타났다(Fig. 4-D).

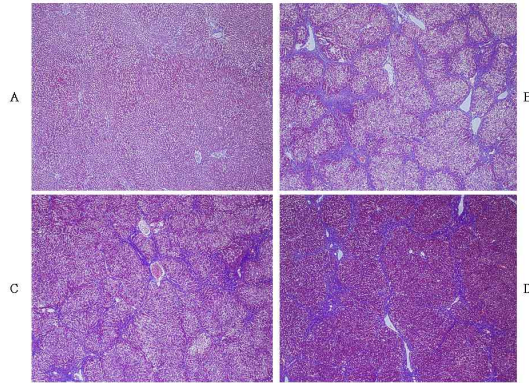


Fig. 4. Histological findings of TAA induced liver damages in SD rats(Masson-Trichrome stain, x40).

Collagen fibers are stained in blue color. A)Normal, B)Control : TAA injection only, C) YBR I, and D)YBR II.

간조직 면적중 collagen이 차지하는 면적의 비율을 측정하여 percentage로 표시하였다. YBR I군과 YBR II군은 대조군에 비하여 collagen의 양이 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$, Table 10).

관찰결과 YBR I군 및 YBR II군에서 섬유화 억제효과가 있는 것으로 관찰되었다.

Table 10. Percentage of Collagen in TAA-induced Rat Liver Tissue Treated with YBR I and YBR II

	Normal	Control	YBR I	YBR II
% of Collagen	3.66±0.55	19.77±3.59	11.34±4.34*	12.07±3.17*

values represent mean ± S.D.

p values compared with the control group

* ; $p < 0.05$

IV. 고찰

통계청에서 발표한 2008년 국내 사망원인통계에 의하면 간질환은 전체 질환별 사망원인 중 6위이며, 남자의 사망원인은 5위를 차지하며, 여자의 사

망원인은 10위를 차지하고 있다. 특히 40대와 50대에서는 간질환이 사망원인 중 각각 40대에서 3위와 50대에서 2위를 하나를 차지하고 있다¹.

만성 간질환은 원인이 무엇이든지 선행되는 염증에 의하여 간섬유화가 진행되고, 계속되는 간섬유화의 과정을 거쳐 간경변증을 유발하므로 간섬유화 억제 논문에 있어서 간섬유화와 관련된 연구의 중요성과 효과적인 치료대책이 더욱 강조되고 있다.

간섬유화는 간경변증의 전구병변으로 만성 간질환을 일으키는 심한 간손상의 결과로, 콜라겐을 포함하여 비정상적인 세포외기질 단백질이 축적되는 것이다. 일반적으로 간섬유화는 간경변과 달리 가역적인 thin fibril로 구성되며, 결절 형성이 없는 것으로 알려져 있고 간손상의 원인이 소실되면 정상회복이 가능할 수 있다. 간섬유화 과정이 반복적으로 지속되면 세포외기질 간 교환결합이 증가하여 thick fibril을 형성하고 결절이 있는 비가역적인 간경변증으로 진행된다¹². 간섬유화의 중요기전은 간성상세포가 활성화되어 근섬유아세포와 유사한 형질을 띠고 세포증식이 증가하며 다양한 세포외기질 물질을 합성하고 분비한다. 간성상세포는 동모양 혈관 내피세포와 간세포 사이의 Disse's space에 위치한 별모양의 세포로서 손상 받은 간세포나 Kupffer 세포 등에서 분비된 여러 가지 cytokine이나 oxidative stress 등에 의해 자극을 받으면 platelet derived growth factor와 TGF- β 의 수용체가 발현하고 이와 더불어 IV형 collagenase를 분비하여 세포 주변을 둘러싸고 있는 기저막을 손상시킨다¹³.

간섬유화와 연관된 것으로는 ASMA(Antibody of Smooth Muscle Actin), procollagen type 1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 등이 알려져 있는데, ASMA는 간성상세포의 활성을 반영하는 지표로 삼고 있으며 휴식기의 정상세포 평활근 actin에 대한 항체로 염색하면 세포주위와 가느다란 세포질 돌기에 면역 염색이 발현되고, 이때 다른 유동세포와 간세포 등은 ASMA에 음성을 보인다. 간섬유화가 진행되

면 피사부위의 모든 정상세포는 증창되고 ASMA에 강한 양성을 보이게 된다¹⁴. Collagen은 생체에서 Procollagen이라는 전구물질로 우선 합성이 되고 이것은 collagen의 카르복실기말단 및 아미노기말단에 propeptide라는 부가적인 peptide sequence가 포함되어 있는 것으로서 세망내피계에서 삼중나선구조를 하도록 유도한다. propeptide가 분리시 삼중나선구조의 collagen은 세포외 collagen 원섬유로 중합되게 된다. 즉 분리된 propeptide의 양은 합성된 collagen의 생성량과 비례하게 된다. Procollagen type I은 간세포나 쿠퍼세포 등이 손상되면 분비되는 TGF- β , PDGF와 같은 cytokine에 의해서 기저막이 손상되고 정상세포가 활성화되면서 증가한다¹⁵.

진행된 간섬유화 치료에 대한 방법으로는 다음과 같다. 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 것이다¹⁶. 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.

임상에서 한약물에 의한 간질환 치료에서 淸熱利濕을 중심으로 하는 生肝健脾湯 과 加減生肝湯, 茵陳淸肝湯 등이 바이러스성 간염과 알콜성 간염 환자에서 환자의 간기능과 임상증상을 호전시켰다고 보고하였다. 茵陳淸肝湯은 淸熱利濕하는 茵陳四苓散에 涼血止血, 下氣行滯하는 地榆, 靑皮, 蘿菘子, 覆盆子 등을 가미한 처방이다¹⁷. 茵陳淸肝湯에 대한 研究로는, 禹¹⁸가 만성 B형 간염 환자에 대한 임상 보고에서 혈청학적 검사상 AST, ALT 등의 간기능 개선과 HBeAg의 음전에 대한 효과가 있다고 보고하였다. 承¹⁹은 茵陳淸肝湯이 간기능 손상의 회복 및 간섬유화로의 진행억제효과가 있음을 보

고하였다. 또 金⁸은 collagen 합성의 1차적인 원인으로 인정되는 간성상세포를 대상으로 각각 인진 이 간성상세포의 활성화 증식을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다. 朴⁷은 茵陳清肝湯이 TAA로 유도된 흰쥐의 간경변증 모델에서 간섬유화 억제 효과 및 간세포보호 효과가 있다고 보고하였다. 또한 다른 한약제의 간경변증 및 간섬유화 억제에 대한 다양한 실험적 보고도 계속 되었다. 崔⁹는 단삼이 간성상세포의 활성화 증식을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다. 李²⁰는 生肝健脾湯加三七根이 TAA로 유발된 흰쥐의 간경변증 모델에서 섬유화 억제 및 간세포 보호 효과가 있다고 보고하였다.

본 실험에서는 간섬유화 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀진 茵陳清肝湯의 구성약재 중 가장 기본이 되는 약재인 茵陳, 白朮, 茯苓으로 구성된 YBR I과 임상에서 간경화 환자의 혈액검사상 지혈기전에 문제가 있어서 출혈 경향이 있는 환자에게 지혈효과를 높이는 목적으로 쓰이는 약재인 地榆炒, 側柏炒, 大薊炒를 YBR I에 가한 YBR II를 가지고 간섬유화 및 염증 관련 유전자에 미치는 효과를 관찰하려 하였다. YBR I의 구성 약재의 효능을 살펴보면 茵陳은 清熱利濕, 退黃疸하여 濕熱黃疸, 寒濕黃疸에 사용하며 간세포 보호, 담즙분비촉진, 간암 억제, 항산화기전 활성화, B형 간염바이러스 증식 억제, 지질강화 효능, 간성상세포의 collagen 생성 억제효능이 있고, 茯苓은 生津止渴, 利水滲濕, 健脾益氣, 寧心安神하며 간세포 보호 작용이 있으며, 白朮은 健脾益氣, 燥濕利尿하며 간세포를 보호하며, 이담작용을 한다고 알려져 있다. YBR II에 추가된 약재를 살펴보면 地榆炒는 涼血止血, 解毒斂瘡하며, 側柏炒는 涼血止血, 止咳化痰하고, 大薊炒는 涼血止血, 祛瘀消腫하는 효능이 있다고 알려져 있다²¹. YBR I은 향후 유효약물의 최소화를 통한 약제의 단순화 및 사용의 편의성을 도모하는 차원에서 고려되었고, YBR II는 혈액검사상 지혈기전과 관련 있는 혈소판 수의 변화 및 기타 간질환에 미치는 직접적인 효과를 관찰하기

위해 구성된 내용이다.

간경변의 동물모델은 간경변과 관련된 치료 및 기전의 연구에 있어서 매우 중요하다. 간섬유화 동물모델은 간섬유화를 유발하는 방법에 따라 크게 간독성물질, 면역학적 손상²², 담도결찰²³, 알코올성²⁴ 등이 있다. 간독성 물질은 주로 사염화탄소²⁵, dimethylnitrosamine²⁶ 및 thioacetamide²⁷를 이용하는 방법들이 있다.

Thioacetamide(TAA) 경구투여로 유도된 간경변은 비교적 장기간(2-3개월)에 걸쳐서 형성된다는 점과 문맥 주변으로 염증 반응과 섬유화 소견이 관찰된다는 점에서 사람의 간경변증과 매우 닮은 모델이다^{28,29}. TAA에 의한 간손상이 간조직에 균일하게 발생하지 않고 주로 중심정맥 주위에 심하게 발생하는 것은 중심정맥 주위에 있는 간세포에 독성대사물의 형성에 관여하는 효소인 cytochrome P-450의 농도가 가장 높고, 중심 정맥 부위가 혈류를 공급하는 문맥부위에서 가장 멀리 떨어져 있어 영양의 공급이 가장 낮고 간손상 물질에 대한 저항력이 가장 낮은 부위이기 때문이다. TAA를 이용한 쥐의 간경변 모델은 사람의 경우와 형태학적, 생화학적 특징이 유사하여 재시행시 동일한 병변을 얻을 수 있으며 사망률이 낮은 것으로 보고되고 있다^{30,31}. 또한 TAA에 의해 유도되는 간경변증은 시간이 경과함에 따라 TAA 그 자체에 의한 독성보다는 cytochrome P450 효소에 의하여 생성되는 thioacetamide S-oxide에 의한 독성으로 인해 대사활성화 과정이 요구되는 것으로 알려져 있다³². 또한 TAA는 저용량에서는 세포 자멸(Apoptosis)을 유발하나 용량을 올리면 지방과산화와 소염중심성 괴사를 유발한다. 특히 TAA 모델은 CCl₄ 모델보다 재생 결절과 간섬유화가 더 뚜렷하고 조직 소견이 사람 간경변증과 더 유사하다고 평가된다³³. 최근까지 흰쥐를 대상으로 한 한약의 간섬유화 연구는 사염화탄소¹⁹, DMN11으로 유발된 간경변 모델을 대상으로 하였으며, 본 연구는 사람의 간경변과 매우 유사한 TAA로 유발된 간경변 모델을 대

상으로 하였다. 따라서 TAA로 유발된 흰쥐 모델을 통해 한약 처방의 간섬유화 효과에 대해 보다 객관적인 결과를 검증하면서, 향후 유효약물의 최소화를 통한 약제의 단순화 및 사용의 편의성을 도모할 수 있고, 약제의 활용범위를 넓히는 기초자료로 사용할 수 있다.

본 연구에서는 세포 실험 및 동물 실험으로 나누어 진행하였다. 세포 실험은 정상군, 대조군(TAA군), YBR I군(인진, 복령, 백출), YBR II(인진, 복령, 백출, 지유초, 측백초, 대개초)으로 나누어 간성상세포의 활성도(MTT Assay), 증식도(BrdU), Procollagen 합성, IL-6 발현으로 측정하였다. TAA로 유발 동물실험에서는 정상군, 대조군(TAA 단독 투여), TAA+YBR I군, TAA+YBR II군으로 나누어 이들 처방의 간기능개선 및 간보호에 미치는 영향을 살펴보았다. 항목으로는 간기능검사, 일반 혈액검사, 간의 무게, 문맥압 측정을 채택하였고, Real-Time PCR 및 병리조직학적 관찰을 하였다. 또한 각 처방의 차이를 두고 각 항목을 비교관찰하였다.

각 처방군이 간성상세포의 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 실험시 한약제의 농도는 적절한 농도로 배지에 희석하여 투여하였으며, 약제의 처리농도는 0 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 300 μ g/ml, 400 μ g/ml, 500 μ g/ml로 결정하였고, 처리시간은 24시간, 48시간, 72시간으로 하였다. MTT는 살아있는 세포의 mitochondria에서 대사작용이 일어나는 화합물이며 대사작용이 일어난 후에는 그 색이 변하게 된다. 각 농도별 well의 colorimetric activity를 측정함으로써 실험을 하는 방법이다. 살아있는 세포에서만 색이 변하는 변화가 나타남으로 간성상세포의 viability를 알아볼 수 있다. YBR I군 및 YBR II군을 증류수로 각각 추출하여 필요한 농도로 희석하여 실험을 하였다. 24시간 약제처리후 나타난 결과를 통계처리하였을 때, 유의성 있는 농도의존적인 세포활성도의 감소($p < 0.05$)가 나타났다(Table 2). 특히 YBR

II군이 더욱 활성도가 감소하는 경향이 나타났다. 48시간 약제처리한 결과(Table 2) 및 72시간 약제처리한 결과(Table 2)도 농도의존적인 활성도의 유의성 있는 감소결과($p < 0.05$)가 나타났는데, 더 장시간 약제처리할수록 간성상세포의 활성도가 감소하는 정도가 큰 것으로 나타났다.

각 처방군이 간성상세포의 증식도에 미치는 영향을 확인하기 위해 BrdU Assay를 시행하였다. MTT assay 결과에서 500 μ g/ml의 농도에서 48, 72시간 처리군의 세포활성도가 낮아져 세포에 대한 직접적인 독성의 가능성을 고려하여 이 농도는 제외하였다. 실험시 한약제는 적절한 농도로 배지에 희석하여 투여하였으며, 최종 약제의 처리농도는 0 μ g/ml, 31.25 μ g/ml, 62.5 μ g/ml, 125 μ g/ml, 250 μ g/ml로 결정하였고, 처리시간은 24시간, 48시간으로 하였다. 24시간 및 48시간 모두 고농도로 갈수록 세포증식도가 감소하는 경향을 나타내었고, 특히 YBR II군에서 증식도가 뚜렷히 감소하였다(Table 3).

각 처방군이 간성상세포의 collagen 합성에 미치는 영향을 유전자의 변화 양상을 통하여 파악하고자 Procollagen 합성 및 IL-6 생성의 변화 양상을 살펴보았다. Procollagen 합성은 24시간 및 48시간 약제 처리 결과, 농도가 증가할수록 Procollagen 합성이 감소하는 경향이 나타났다(Table 4). IL-6의 생성은 24시간 약제 처리 시 YBR I군에서 농도가 증가할수록 다소 증가하는 경향이 있었고, YBR II군은 농도에 따른 차이가 거의 없었다(Table 5). 이는 간성상세포의 재생이 YBR I군에서만 다소 증가한다고 볼 수 있다. 48시간 약제 처리 시에는 YBR I군에서는 농도에 따른 차이가 거의 없었으나 YBR II군은 농도가 증가할수록 오히려 다소 감소하는 경향이 나타났다(Table 5).

정상군, 대조군, YBR I군, YBR II군으로 나누어 6주간 각 군의 실험동물의 중량을 측정한 결과 최초 정상군은 357g, 대조군은 342g, YBR I군은 330g, YBR II군은 331g이었고, 6주후 정상군은

426g, 대조군은 355g, YBR I군은 361g, YBR II군은 339g이었다. 정상군은 체중이 점진적으로 증가하였으며, 대조군과 YBR I군 및 YBR II군의 체중에는 별 차이가 발생하지 않았으며, 세 군 모두 정상군에 비해서는 체중이 감소하였다(Fig. 1).

6주후 간과 비장의 무게를 측정한 결과에서 간의 중량은 정상군에서 12.8g, 대조군에서 16.1g, YBR I군에서 16.8g, YBR II군에서 14.2g 이었다. 대조군, YBR I군과 YBR II군에서 모두 정상군에 비하여 높아지는 경향이 있었으며, 또한 대조군에 비하여 YBR I군은 높은 경향을 보였다(Table 6). 이는 간세포 파괴이후 재생과정 중 간의 중량이 증가한 것으로 추측되어진다. 그러나 YBR II군은 대조군에 비해 간중량이 감소하였다. 비장의 중량은 정상군에서 0.8g, 대조군에서 0.9g이었고, YBR I군에서 1.0g, YBR II군에서 1.0g 이었다. YBR I군과 YBR II군에서 정상군과 대조군에 비하여 비장 무게가 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 6).

간경변증 유발을 위해 6주간 TAA를 복강주사한 후 간기능검사 수치를 관찰하였다(Table 8). 대조군에서는 전체적으로 정상군에 비하여 간기능저하 소견을 보여주고 있으며 AST, Alp, GGT에 대하여는 유의한 수치의 상승을 일으킴이 관찰되었다. 6주간 TAA 및 한약처방을 투여한 실험에서 각 군 간 간기능검사 수치를 관찰한 결과 AST는 YBR I군에서 대조군에 비하여 수치가 유의하게 낮아졌으며, YBR II군에서는 대조군에 비하여 다소 감소하는 경향을 보였다. ALT는 YBR I군에서 대조군에 비하여 낮아지는 경향을 보였으며, YBR II군에서는 대조군에 비하여 다소 감소하는 경향이 있었다. Alp는 대조군에 비해 YBR I군이 다소 감소하였으며 YBR II군은 별 차이가 없었다. GGT는 대조군에 비해 YBR I군이 감소하는 경향을 보였으며, YBR II군에서 대조군에 비하여 다소 상승하는 경향이 있었다. YBR II군보다 YBR I군에서 간기능수치가 호전되는 것으로 보아 간기능개

선 및 간보호 효과가 YBR I군에서 뚜렷하였으며 오히려 YBR II군에서는 간기능수치가 대조군에 비하여 별 차이가 없었다.

일반혈액검사 수치를 관찰한 결과, WBC는 정상군에 비해 증가한 대조군 수치를 YBR I, YBR II군에서 감소시키는 경향을 보였다(Table 8). RBC는 정상군에 비하여 대조군 및 YBR I군, YBR II군에서 감소하는 경향을 보였다. Hgb은 정상군에 비하여 대조군 및 YBR I군, YBR II군에서 감소하는 경향을 보였다. Hct는 정상군에 비하여 대조군 및 YBR I군에서 감소하는 경향을 보였고, YBR II군(p<0.05)에서 유의하게 감소하였다. PLT는 정상군보다 증가한 대조군 수치를 YBR I군 및 YBR II군에서 감소하는 경향을 보였고 특히 YBR II군이 유의하게 감소하였다(Table 8).

문맥압 측정 결과, 대조군과 YBR I군 및 YBR II군은 정상군에 비하여 모두 문맥압이 상승하였다(p<0.05). YBR I군에서는 대조군에 비하여 유의하게 문맥압이 하강하였다(p<0.05). YBR II군에서는 15.5cmH₂O로 대조군보다 다소 높았으나 통계적 유의성은 없었다(Table 9). 이는 YBR I군에서 간경변시 상승하는 문맥압을 하강시킴을 알 수 있었고 이는 간내 혈류 흐름이 호전됨을 의미하는 것으로 판단되었다.

간섬유화와 관련하여 matrix metalloproteinases (MMPs)와 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, 본 연구에서도 YBR I인 인진, 복령, 백출 및 YBR II인 인진, 복령, 백출, 지유초, 측백초, 대계초 구성물이 TAA 유발 간경변동물 모델에서 간섬유화 관련 유전자인 Collagen type Ia1, ASMA, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2의 유전자 및 염증과 재생에 관련된 IL-6 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Real-Time PCR을 이용하였다.

TAA를 주입한 대조군에서는 콜라겐 합성이 증가될 때 발현이 증가되는 Collagen type Ia1, ASMA, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 유전자가 증가하였다

(Fig. 2). YBR I군 및 YBR II군은 collagen 합성 관련 유전자의 발현을 억제하여 섬유화 진행을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. YBR I군에서는 대조군에서 ASMA의 발현 증가를 감소시키는 것으로 나타났는데 이는 간성상세포의 활성화가 감소됨을 의미하며 이를 통해 섬유화 진행을 억제하는 효과를 가지는 것을 알 수 있다. 대조군에서 증가된 MMP-2 발현을 YBR I군 및 YBR II군에서 감소시키는데 이는 정상 구조를 구성하는 정상 collagen의 분해를 억제하는 것으로 병적인 collagen의 축적을 막는 효과가 있음을 알 수 있다. 염증반응의 경과 중 간세포의 재생시에 높아지는 것으로 알려진 IL-6의 YBR I군 및 YBR II군에서 다소 증가되었으나 별 차이는 없었다.

간경변증을 유발한 흰쥐에 대하여 Hematoxylin & Eosin염색과 Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였다. 정상군에서는 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었고, 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포 괴사나 염증반응은 관찰되지 않았으며, 문맥역에만 소량의 collagen 침착이 관찰되었다(Fig. 3-A, 4-A). 대조군(TTA)에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 문맥 주위와 중심정맥 주위로 심한 정도의 섬유화 및 Ballooning이 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 심한 간세포 괴사와 이에 동반된 염증반응도 관찰되었으며, 문맥 주위 및 중심정맥 주위로 현저한 collagen 침착이 관찰되었다(Fig. 3-B, 4-B). YBR I군에서는 중등도의 간소엽의 입체구조가 부분적으로 소실되었고 문맥 주위역, 중심정맥부분 및 기타 간조직에서 중등도의 섬유화가 관찰되었으며, 문맥 주위와 중심정맥 주위로 collagen의 침착이 대조군에 비하여 상당히 감소하였다(Fig. 3-C, 4-C). YBR II군에서는 병리조직 소견이 중등도의 섬유화가 관찰되었고, 대조군에 비해 collagen 침착이 감소하였으나 YBR I군에 비하여 간섬유화 소견이 조금 더 심하게 나타났다(Fig. 3-D, 4-D).

간조직 면적중 collagen이 차지하는 면적의 비율

(percentage)은 iM Technology사의 iSolution program을 이용하여 계산하였는데, YBR I군과 YBR II군은 대조군에 비하여 collagen의 차지하는 비율이 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$, Table 10). 이는 YBR I군 및 YBR II군이 섬유화의 주된 요인인 collagen의 합성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다. 상기의 섬유화 관련 유전인자의 발현량과 종합컨대, collagen 형성 억제 효과는 간성상세포 활성화 억제에 대한 효과 및 collagen 분해를 촉진시키는 효과로 간 섬유화 억제 및 간세포의 재생을 돕는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 세포 실험에서 YBR I 및 YBR II에서 간성상세포의 활성화 증식을 억제하는 효과가 있었음을 볼 수 있었고, Procollagen 합성량도 억제하였다. 또한 IL-6 생성량은 24시간 및 48시간 약제처리시에 별 영향이 없었다. TAA 유발 간경변 동물모델에서는 YBR I군이 간기능검사 수치와 호전을 통해 간기능개선과 간보호 효과를 나타내었다. YBR I군은 대조군에서 상승하는 문맥압을 유의하게 하강시켰다. ASMA 발현량을 감소시켜 간성상세포의 활성화억제 효과 및 MMP-2 발현량을 감소시킴으로써 병적인 collagen의 축적을 막는 효과를 나타내었고, 간조직 검사에서는 YBR I군 및 YBR II군이 collagen 형성을 유의하게 억제하는 효과를 나타내었다. 상기의 결과들에서 공통적으로 YBR I군은 YBR II군에 비하여 간섬유화 억제효과가 우수한 것으로 관찰되었다. 향후 지혈약제들이 간섬유화에 미치는 영향에 관한 심화연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 인진청간당 중 간섬유화 및 간세포 보호에 유효한 약물의 최소화 및 적정성을 위한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

인진청간당의 주요 약물인 YBR I군(인진, 백출, 복령) 및 II군(인진, 백출, 복령, 지유초, 측백초, 대계초)이 간섬유화 및 염증관련 유전자의 변화에

미치는 영향을 알아보기 위하여, 세포실험에서 간성상세포의 활성화도, 증식도, Procollagen 합성 및 IL-6 생성을 측정하였으며, 동물실험에서는 흰쥐에 TAA 유도 간경변증 모델을 유발하여 체중변화와 간,비장 중량측정, 간기능검사, 일반혈액검사, 문맥압 측정을 시행하였다. 또한 간섬유화 관련 유전자들의 발현을 관찰하였으며 병리조직검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. YBR I군 및 YBR II군은 MTT를 통한 간성상세포의 활성도를 측정한 결과 간성상세포 활성도를 유의성 있게 억제하였고, YBR I군이 더 유의하게 억제하였다.
2. YBR I군 및 YBR II군은 BrdU를 통한 간성상세포의 증식도를 측정한 결과 유의성 있게 증식을 억제하였고, YBR II군이 더 증식도를 억제하였다.
3. YBR I군 및 YBR II군은 Procollagen 합성을 측정한 결과 농도의존적으로 감소시켰고, YBR I군이 더 뚜렷하게 감소하는 경향이 있었다.
4. YBR I군 및 YBR II군은 IL-6 생성에 별다른 변화를 나타내지 않았다.
5. TAA 간섬유화 모델에서 체중 변화를 측정한 결과 대조군과 YBR I군 및 YBR II군에서 별 차이는 없었다.
6. YBR I군 및 YBR II군은 TAA 간섬유화 모델에서 간장 및 비장의 중량은 유의성 있는 변화가 없었다.
7. YBR I군 및 YBR II군은 간기능검사 결과 대조군에 비하여 AST 수치가 유의하게 감소하였고, ALT 및 Alp는 대조군에 비해 감소시켰다. GGT는 대조군에 비해 YBR I군에서 감소하는 경향이 있었고, YBR II군은 대조군에 비해 다소 상승하는 경향이 있었다.
8. YBR I군 및 YBR II군은 일반혈액검사 결과 WBC는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었고, RBC, Hgb 및 Hct는 별 차이가 나타나

지 않았다.

9. YBR I군은 문맥압 측정 결과 투여군에서 대조군에 비하여 문맥압이 유의하게 하강하였고, YBR II군은 대조군과 별 차이가 없었다.
10. YBR I군 및 YBR II군은 Real-Time PCR을 통한 섬유화 관련 유전자 발현량 조사 결과 ASMA 발현량은 감소하였고, MMP-2 발현량이 감소하였으나, IL-6 발현량은 별 차이가 없었다.
11. YBR I군 및 YBR II군은 간조직 병리검사에서 Masson-Trichrome 염색으로 정량검사상 대조군에 비하여 간조직중 collagen이 차지하는 비율이 모두 유의성 있게 적게 나타났고, YBR I군이 YBR II군보다 더 효과가 뚜렷하였다.

이상의 실험결과에서 인진청간당 구성약제 중 유효약물의 최소한의 구성 처방인 YBR I군 및 그 활용범위의 확대 처방인 YBR II군이 간섬유화 억제 효과를 나타내었다. 향후 간섬유화 억제 약물에 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. 통계청. 2008년 사망원인통계결과.
2. 전국한외과대학 간계내과학 교수 공저. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001, p. 323-5.
3. Friedman SL. Liver fibrosis—from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003;s38-s53.
4. 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.
5. Simile MM, Banni S, Angioni E, Carta G, De Miglio MR, Muroni 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.
6. 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.
 7. 박신명, 김영철, 이장훈, 우홍정. TAA로 유발된 간섬유화 동물 모델에서 인진청간당의 효과. 대한한방내과학회지. 2009;30(2):270-87.
 8. 김성아, 우홍정, 김영철, 이장훈. 인진이 간성상 세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):177-88.
 9. 최은경, 이장훈, 김영철, 우홍정. 단삼이 간성상 세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(2):229-310.
 10. 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당이 흰쥐의 간장 비실질세포의 procollagen 합성 억제에 미치는 효과에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 2003;24(4):817-25.
 11. 박상백, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당이 DMN 유발 간섬유화와 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):200-18.
 12. 이관식, 간섬유화 기전. 대한간학회 제3차 Postgraduate Course. 2005;9-19.
 13. Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:95-107.
 14. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med.* 1993;25:1828-35.
 15. 정규원. 만성 간질환의 미세구조-간섬유조직증식과 간유동의 정상세포. 대한간학회지. 2002; 8(3):343-53.
 16. 권영오. 간섬유화 치료의 최신지견. 대한간학회 제3차 Postgraduate Course. 2005;33-9.
 17. 경희대학교 부속한방병원. 경희한방처방집. 서울: 트윈기획; 1997, p. 244.
 18. 우홍정. 만성B형간염에 대한 인진청간당의 효과. 제2회 한중 학술대회 참가 논문집(간장병). 1995;18-53.
 19. 승현석, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간당이 간보호 및 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):21-32.
 20. 이은, 김영철, 고흥. 生肝健脾湯加三七根이 흰 쥐의 감선유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(2):500-11.
 21. 전국한의과대학 본초학교수 편저. *本草學*. 영림사; 1994, p. 328, 302, 536, 392, 395, 390.
 22. 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.
 23. 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-G80.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.

28. Muller A, Machnik F, Zimmermann T, et al. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats usefulness and reliability of this animal model. *Exp Pathol.* 1988;34:229-36.
29. Jeong TC, Gu HK, Park JI, Yun HI, Kim HC, Ha CS et al. Pretreatment of male BALB/c mice with beta-ionone potentiates thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* 1999;105:39-46.
30. 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.
31. Jang KT, Lee MS, Jung IP, Kim MR, Jang JJ. Effect of pehtoxifylline on liver fibrosis and cell cycle related proteins in thioacetamide-induced rat cirrhosis. *Korean J Hepatol.* 2001;7:281-91.
32. Kim KH, Bae JH, Cha SW, Han SS, Pa가 KH, Jeong TC. Role of metabolic activation by cytochrome P450 in thioacetamide-induced suppression of antibody response in male BALB/c mice. *Toxicol Lett.* 1999;105:39-46.
33. Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology.* 1988;3:112-20.