

白屈菜가 간섬유화 과정 중 간성상세포에 미치는 영향

이홍일, 김영철

경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effect of Greater Celandine (*Chelidonium majus* L.) on Rat Hepatic Stellate Cells with Liver Fibrosis

Hong-il Lee, 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 greater celandine on cultured rat hepatic stellate cells.

Materials and Methods : Hepatic stellate cells (HSC-T6) were treated with various concentrations of greater celandine extract for 24, 48, and 72 hours. The extraction was done with distilled water. After the treatment, cell viability, proliferation, mRNA of the α SMA, TIMP-1, TIMP-2, collagen I α 1, MMP-2, IL-6, TGF- β 1, PDGFr- β 1, Bcl-2, Bax, Bcl-xl, caspase-3, caspase-9 and the activities of SOD and catalase were measured by using MTT assay, BrdU assay, real-time PCR, superoxide dismutase assay and catalase assay.

Results : The viability, proliferation, mRNA expression and synthesis of collagen of the hepatic stellate cells were inhibited as the concentration increased, which indicates the herb has an inhibitory effect on fibrogenesis of the liver by regulating the fibrosis associated genes in transcription.

Conclusions : These results suggest that greater celandine would be beneficial in the treatment of fibrotic patients as well as for patients with chronic hepatitis.

Key words : Greater celandine (*Chelidonium majus* L.), liver fibrosis, hepatic stellate cell (HSC), HSC-T6

1. 서론

간섬유화는 높은 사망률을 일으키는 내과 질병 중의 주요한 원인 중의 하나로 바이러스, 알코올, 자가면역 이상, 약물 등에 의한 손상을 포함한 여러 가지 만성 간 손상으로부터 치유되는 과정 중에 생기는 것이다¹. 간섬유화가 진행되는 기전에

있어서 간성상세포의 활성화가 가장 중요한 역할을 한다. 간섬유화/간경변의 진행을 억제하기 위해서는 간섬유화를 유발하는 기저질환을 치료하는 것이 근본이 되고, 다음으로는 염증의 치료 및 과도한 면역반응을 억제하며, 섬유질생성의 바탕이 되는 간성상세포의 활성화 및 증식을 억제하고, apoptosis를 유도하며, 콜라겐의 생성 및 축적을 감소시키고, 흉터조직을 감소시키는 등^{2,3}의 방법을 고려할 수 있다.

간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)는 염증, 세포독성 등 자극을 받으면 활성화하고 증식하며,

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

콜라겐을 포함한 다양한 세포외기질 물질을 합성하고 분비하게 되고⁴, 이렇게 간소엽 전체에 광범위하게 축적된 콜라겐은 혈류의 흐름과 간세포의 물질교환 등을 방해하게 되어 간섬유화/간경변을 진행시키게 된다.

白屈菜(greater celandine 또는 *Chelidonium majus* L.)는 양귀비과의 애기똥풀로 아시아, 유럽에 광범위하게 분포하고 있고⁵, 치료목적으로 한의학에서나 서양의 식물요법에서 오랜 기간 사용되어 왔다. 기존 연구에서 白屈菜는 항염증, 항종양, 항균, 항바이러스, 항미생물, 진통 등의 작용이 있음이 보고되었다⁶⁻⁸. 반면에 白屈菜는 변비, 담낭 결석, 위상복부 통증, 아토피성 습진, 소화 불량 등의 부작용을 유발할 수 있음⁹도 보고된 바 있어서 임상에서 백굴채를 사용 할 때에는 투여량을 신중히 조절하여야 한다. 중국 중의 임상에서는 위장 통증, 수증, 황달, 간경화복수, 백일해, 만성기관지염 등 질환에 사용되고 있어서¹⁰ 간질환에 사용할 수 있을 것으로 여겨지지만, 한의학 임상에서 白屈菜를 간질환에 투여하거나 실험적으로 간성상세포에 직접 처리하여 효능을 검증한 예는 없는 상황이다.

이에 본 연구에서는 간성상세포에 미치는 白屈菜의 간섬유화 억제효과를 관찰하기 위하여 MTT assay 와 BrdU assay, superoxide dismutase assay, catalase assay, real-time PCR를 시행하고 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 제

본 실험에서 사용한 약제는 대한약전의 한약규격집¹¹에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였다.

2) 검액의 조제

白屈菜 500 g을 round bottomed flask에 넣고 증류수 3 l 과 함께 2시간 동안 전탕하였다. 이를 상

온으로 식힌 후 whattmann paper를 통과시켜 여과한 다음 여과용액을 rotary evaporator에서 감압 농축하였다. 농축용액을 동결 건조시켜 분말 상태의 추출물 100 g(收率:20%) 얻었다.

3) 시 약

Fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), antibiotics는 Gibco(CA, USA)사, n-Propanol, dimethyl thiazoly diphenyl tetrazolium salt(MTT)는 Sigma(MO, USA)사, 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III(BrdU Kit)는 Roche(Mannheim, Germany)사, RNeasy Mini Plus Kit는 Qiagen(CA, USA), RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit는 Fermentas(Waltham, USA)사, POWER SYBR GREEN PCR MASTER MIX는 Applied Biosystems(CA, USA)사, superoxide dismutase assay kit, catalase assay kit는 Cayman Chemical(MI, USA)사, 나머지 plastic labware는 SPL(Pocheon, Korea)사로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) Cell culture

Rat의 간성상세포주 HSC-T6(kind gift of Dr. Scott L. Friedman)를 사용하였다. 배양액으로는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin를 함유한 DMEM을 사용하였고, 37 °C, 5% CO₂ incubator(항온배양기)에 배양하였다.

2) 약제처리

白屈菜 추출물을 5 mg/ml농도로 DMEM에 녹여 0.2 μm syringe filter에 여과시켜 필요한 농도로 희석해서 실험에 사용하였다.

3) MTT assay

HSC-T6를 24-well plate에 1×10⁴/ml의 농도로 분주하고 12시간 후 약제처리 하지 않은 군을 대조군으로 하고 실험군에는 白屈菜 추출물을 50 μg/ml, 150 μg/ml, 300 μg/ml농도로 처리한 후 24시간, 48시간, 72시간별로 MTT assay를 하였다. 즉 MTT

powder를 2 mg/ml의 비율로 DMEM에 희석하여 MTT solution을 만들고 각 well에 200 μ l의 MTT solution을 넣고 45분 동안 incubator에 배양하였다. Medium을 제거하고 각 well에 100 μ l의 n-propanol을 넣은 후 5-10분간 흔들며 주면서 세포를 충분히 녹였다. 각 well에서 용액을 50 μ l씩 추출하여 96-well plate로 옮긴 후 570 nm 파장으로 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

4) BrdU assay

HSC-T6를 96-well plate에 2×10^4 /ml의 농도로 세포를 분주하고 24시간 후 약제처리 하지 않은 군을 대조군으로 하고 실험군에는 白屈菜 추출물을 50 μ g/ml, 150 μ g/ml, 300 μ g/ml의 농도로 처리한 후 각각 24시간, 48시간, 72시간 후에 BrdU assay를 하였다. 즉 각 well에 BrdU labeling solution을 추가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 incubator에서 12시간 배양하였다. Culture medium을 제거하고 각 well에 washing medium을 넣어 세포를 씻어낸 후 각 well에 pre-cooled fixative를 넣고 세포를 -20 $^{\circ}$ C의 온도에서 30분간 고정시켰다. Fixative를 제거하고 각 well에 washing medium을 넣어 세포를 씻어낸 후 각 well에 nucleases working solution을 넣고 37 $^{\circ}$ C의 waterbath에서 30분간 배양하였다. Nucleases working solution을 제거하고 각 well에 wash medium을 넣고 세포를 씻어낸 후 각 well에 anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution을 넣고 incubator에서 30분간 배양하였다. Antibody conjugate를 제거하고 washing buffer를 넣어 세포를 씻어낸 후 각 well에 peroxidase substrate를 넣은 후 반응 양성 샘플들이 초록빛을 나타낼 때까지 빛을 차단한 상태로 샘플들을 배양하였다. 490 nm의 참조 파장에서 405 nm의 파장으로 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

5) Real-time PCR

(1) RNA 추출

HSC-T6를 6-well plate에 2×10^4 /ml 농도로 분주하고 12시간 후 약제처리 하지 않은 군을 대조군으로

로 하고 실험군에는 白屈菜 추출물을 50 μ g/ml, 150 μ g/ml, 300 μ g/ml 농도로 처리하고 24시간, 48시간, 72시간별로 Qiagen사의 RNeasy mini plus kit를 이용하여 제작사의 지시대로 RNA를 분리하였다.

(2) cDNA(complementary deoxynucleotide acid) 합성

Fermentas사의 RevertAid first-strand cDNA synthesis kit를 사용하여 제작사의 지시대로 시행하였다.

즉 1 μ g의 RNA와 1 μ l의 random primer를 DEPC-처리된 증류수를 첨가하여 전체 볼륨을 12 μ l가 되게 조정하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 얼음에 5분간 두었다. 다음 4 μ l의 5 \times reaction buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3), 1 μ l의 RiboLockTM RNase inhibitor(20 u/ μ l), 2 μ l의 10 mM deoxynucleoside triphosphate(dNTP) MIX, 1 μ l의 RevertAidTM M-MuLV reverse transcriptase(200 u/ μ l)를 넣어 전체 볼륨을 20 μ l되게 조정하고 부드럽게 흔들어준다. 반응조건은 25 $^{\circ}$ C에서 5분간, 42 $^{\circ}$ C에서 60분간, 70 $^{\circ}$ C에서 5분간으로 하여 BIO-RAD사의 Peltier thermal cycler로 반응시켰다. 합성된 cDNA는 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였으며 필요할 때마다 사용하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로는 beta-actin(β -actin)을 사용하였고, target gene으로는 alpha smooth muscle actin(α SMA), tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1, TIMP-2), matrix metalloproteinase(MMP-2), collagen type I alpha 1(Collagen Ia1), transforming growth factor beta 1(TGF- β 1), interleukin-6(IL-6), platelet derived growth factor receptor - beta 1(PDGFr- β 1), B-cell lymphoma 2(Bcl-2), Bcl-2-associated X protein(Bax), B-cell lymphoma-extra large(Bcl-xl), cysteine-dependent aspartate-directed proteases(caspase-3, caspase-9) gene을 사용하였으며 각 primer의 sequence는 다음과 같이 제작하여 실험에 사용하였다.

Genes	Primer sequences	Size	℃	Genebank
β -actin	CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC	150	60	NM_031144
α SMA	GAC CCT GAA GTA TCC GAT AGA ACA CAC GCG AAG CTC GTT ATA GAA G	94	60	NM_031004.2
MMP-2	AGG ATG GAG GCA CGA TTG G CTT GAT GAT GGG CGA CGG T	111	60	NM_031054
TIMP-1	GGG CTA CCA GAG CGA TCA CTT AAG GTA TTG CCA GGT GCA CAA	67	60	NM_053819
TIMP-2	ACA TCT CCT CCC CGG ATG A GGT GCC CAT TGA TGC TCT TC	66	60	NM_021989
Collagen I α 1	TCG ATT CAC CTA CAG CAC GC GAC TGT CTT GCC CCA AGT TCC	67	60	NM_053304.1
TGF- β 1	TGA GTG GCT GTC TTT TGA CGT C CCT GTA TTC CGT CTC CTT GGT T	68	60	NM_021578
IL-6	CGA GCC CAC CAG GAA CGA AAG TC CTG GCT GGA AGT CTC TTG CGG AG	84	60	NM_012589.1
PDGFR- β 1	GTG AGC GGA AGC GCA TCT A TCA CTC GGC ATG GAA TCG T	123	60	AY090783
BCI-2	ATA ACC GGG AGA TCG TGA TG CAG GCT GGA AGG AGA AGA TG	132	60	NM_016993
Bcl-xL	GCC ACA AAG AAA CCA ATT CTG CCG GTT GCT CTG AGA CAT TT	151	58	NM_031535.2
Bax	TGT TTG CTG ATG GCA ACT TC GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG	104	60	NM_017059
Caspase-3	CAA GTC GAT GGA CTC TGG AA GTA CCA TTG CGA GCT GAC AT	129	60	NM_012922
Caspase-9	AGC CAG ATG CTG TCC CAT AC CAG GAA CCG CTC TTC TTG TC	148	60	NM_031632

(4) Real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)

PCR은 Applied Biosystems(CA, USA)사의 StepOnePlus real-time PCR system을 사용하여 제작사의 지시대로 시행하였다.

즉 10 μ l의 2 \times SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ l의 cDNA, 1 μ l의 primer(sense), 1 μ l의 primer(anti-sense), 7 μ l의 distilled water를 넣어 전체 볼륨을 20 μ l로 조정하여 준다. PCR 조건은 초기변성(denaturation)은 첫 cycle은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간, 나머지 40 cycle까지는 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 풀림(annealing)

은 60 $^{\circ}$ C에서 10초간, 연장(extension)은 72 $^{\circ}$ C에서 15초간으로 하여 증폭시킨다.

측정된 모든 유전자의 Ct 값을 β -actin에 대조하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 계산하였다.

6) Superoxide dismutase(SOD) assay

HSC-T6를 6-well plate에 2×10^4 /ml 농도로 분주하고 12시간 incubator에 배양한다. 다음 약제처리하지 않은 조를 control군으로, 10 mM 에탄올만 처리한 군을 대조군으로 하고 실험군에는 10 mM 에탄올과 白屈菜 추출물을 50 μ g/ml, 150 μ g/ml, 300 μ g/ml 농도로 처리한다. 24시간, 48시간, 72시간

별로 샘플을 거두어 SOD assay를 시행하였다.

각 well에 10 mM mannitol, 70 mM sucrose, 20 mM HEPES를 함유한 완충액 2 ml씩 넣고 4 °C에 10분간 두었다가 scraper를 사용하여 세포를 떼어내고 tube에 옮긴 후 1500 ×g, 4 °C의 조건으로 5분간 원심분리 시키고 상층액을 거두어 사용하였다.

SOD standard well에는 200 μl radical detector과 10 μl standard를 넣는다. Sample well에는 200 μl radical detector과 10 μl의 샘플을 넣는다. 20 μl의 xanthine oxidase를 전체 well에 넣고 kit에 제공되는 cover로 plate를 덮고 실온에서 shaker로 20분간 흔들어 준다. 440-460 nm 파장으로 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

7) Catalase assay

HSC-T6를 6-well plate에 2×10⁴/ml 농도로 분주하고 12시간 incubator에 배양한다. 다음 약제처리하지 않은 조를 control군으로, 10 mM 에탄올만 처리한 군을 대조군으로 하고 실험군에는 10 mM 에탄올과 白屈菜 추출물을 50 μg/ml, 150 μg/ml, 300 μg/ml 농도로 처리한다. 24시간, 48시간, 72시간 별로 샘플을 거두어 CAT assay를 시행하였다.

각 well에 1 mM EDTA, 50 mM potassium phosphate 함유한 완충액을 2 ml씩 넣고 4 °C에 5분간 두었다가 scraper를 사용하여 세포를 떼어내고 tube에 옮긴 후 10000 ×g, 4 °C의 조건으로 원심분리 시킨 후 상층액을 거두어 사용하였다.

Formaldehyde standard well에는 100 μl의 assay buffer, 30 μl의 methanol과 20 μl의 standard를 넣는다. Positive control well에는 100 μl의 assay buffer, 30 μl의 methanol과 catalase(control)을 넣는다. Sample well에는 100 μl의 assay buffer, 30 μl의 methanol과 20 μl의 샘플을 넣는다. 모든 well에 20 μl의 hydrogen peroxide를 넣고 plate cover로 덮고 실온에서 20분간 shaker로 흔들어준다. 30 μl의 potassium hydroxide를 넣고 반응을 종료시키고 30 μl의 catalase purpald를 넣고 실온에서 shaker로 10분간 흔들어준다. 10 μl의 catalase potassium periodate를 넣고 실온에서 shaker로 5분간 흔들어준다. 540 nm 파장으로 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

8) 통계처리

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

III. 결 과

1. 白屈菜가 HSC-T6 활성화에 미치는 영향(MTT assay)

白屈菜가 간성상세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 한 결과 약제에 의한 농도의존적인 억제효과가 나타났다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of *Greater Celandine* on HSC-T6 Cell Viability Assessed by MTT Assay.

time (hour) \ concentration	0 μg/ml	50 μg/ml	150 μg/ml	300 μg/ml
24	0.228±0.007	0.205±0.011**	0.199±0.002**	0.190±0.002**
48	0.843±0.018	0.726±0.014**	0.657±0.015***	0.532±0.030***
72	1.313±0.024	1.088±0.003***	0.808±0.17***	0.403±0.008***

Values were represented by O.D.(optic density) of each samples (mean ± standard deviations). P-values compared with the none treated (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001).

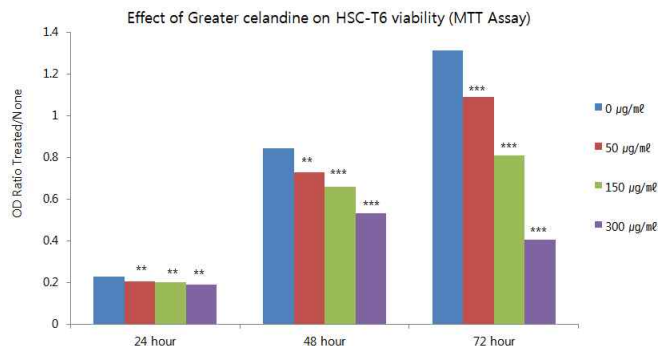


Fig. 1. Effect of greater celandine on HSC-T6 cell viability assessed by MTT assay.

Results show that greater celandine has inhibitory effect on stellate cell viability with dose-dependent manner. P-values compared with the none treated (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

2. 白屈菜가 HSC-T6 증식에 미치는 영향(BrdU assay)
 白屈菜가 간성상세포의 증식에 미치는 영향을

확인해보기 위해, BrdU assay를 한 결과 약제에 의한 농도의존적인 억제효과가 나타났다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effect of Greater Celandine on HSC-T6 Proliferation (BrdU Assay).

time (hour) \ concentration	0 µg/ml	50 µg/ml	150 µg/ml	300 µg/ml
24	1.083±0.107	0.885±0.093*	0.816±0.094*	0.728±0.129*
48	1.732±0.028	1.567±0.017*	1.363±0.04**	1.267±0.068**
72	2.103±0.132	2.015±0.059*	1.736±0.021***	1.387±0.065***

Values were represented by O.D.(optic density) of each samples (mean ± standard deviations). P values compared with the none treated (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

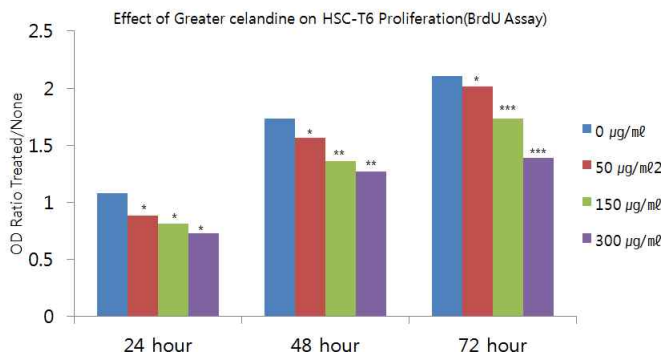


Fig. 2. Effect of greater celandine on HSC-T6 proliferation assessed by BrdU assay.

Results show that greater celandine has inhibitory effect on stellate cell proliferation with dose-dependent manner. P-values compared with the none treated (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

3. 白屈菜가 간섬유화, 염증반응, apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향(RT-PCR)

白屈菜 투여에 의하여 aSMA, TIMP-1, TIMP-2, collagen Ia1, PDGFr-β1, TGF-β1 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰으며 MMP-2, IL-6유

전자의 발현은 48시간, 72시간 투여군에서는 농도 의존적으로 증가 시키는 것을 관찰할 수 있었으나 apoptosis 유관 유전자의 발현에는 농도 의존적인 결과를 보여주지 못했다(Table 3-5, Fig. 3-6).

Table 3. Effect of Greater Celandine on HSC-T6's Gene Expression after Treated 24 Hours.

gene \ concentration	24h-0 $\mu\text{g/ml}$	24h-50 $\mu\text{g/ml}$	24h-150 $\mu\text{g/ml}$	24h-300 $\mu\text{g/ml}$
aSMA	5.05×10^{-4}	4.95×10^{-4}	4.97×10^{-4}	4.45×10^{-4}
TIMP1	0.023	0.022	0.021	0.020
TIMP2	0.014	0.014	0.014	0.011
Collagen Ia1	0.063	0.063	0.062	0.040
PDGFr-β1	4.53×10^{-3}	3.21×10^{-3}	3.07×10^{-3}	1.69×10^{-3}
MMP-2	6.90×10^{-5}	4.96×10^{-5}	5.90×10^{-5}	4.35×10^{-5}
IL-6	2.55×10^{-6}	1.65×10^{-6}	2.11×10^{-6}	1.11×10^{-6}
TGF-β1	9.31×10^{-3}	9.14×10^{-3}	15.7×10^{-3}	9.87×10^{-3}
Bcl-2	6.63×10^{-5}	7.31×10^{-5}	10.61×10^{-5}	6.21×10^{-5}
Bax	2.06×10^{-4}	3.46×10^{-4}	4.73×10^{-4}	3.58×10^{-4}
Bcl-xl	0.011	0.013	0.014	0.011
Caspase-3	1.71×10^{-3}	2.32×10^{-3}	3.03×10^{-3}	2.21×10^{-3}
Caspase-9	2.01×10^{-4}	2.20×10^{-4}	2.79×10^{-4}	2.51×10^{-4}

Values were represented by relative gene expression levels compared to house keeping gene (β -actin), calculated with $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Table 4. Effect of Greater Celandine on HSC-T6's Gene Expression after Treated 48 Hours.

gene \ concentration	48h-0 $\mu\text{g/ml}$	48h-50 $\mu\text{g/ml}$	48h-150 $\mu\text{g/ml}$	48h-300 $\mu\text{g/ml}$
aSMA	1.68×10^{-4}	1.33×10^{-4}	1.07×10^{-4}	0.98×10^{-4}
TIMP1	0.020	0.019	0.018	0.017
TIMP2	0.015	0.009	0.009	0.006
Collagen Ia1	0.053	0.050	0.026	0.017
PDGFr-β1	1.88×10^{-3}	1.36×10^{-3}	1.18×10^{-3}	0.83×10^{-3}
MMP-2	2.97×10^{-5}	4.62×10^{-5}	5.59×10^{-5}	1.90×10^{-4}
IL-6	4.05×10^{-7}	1.81×10^{-6}	6.03×10^{-6}	1.47×10^{-5}
TGF-β1	7.47×10^{-3}	10.65×10^{-3}	13.01×10^{-3}	6.75×10^{-3}
Bcl-2	7.03×10^{-5}	7.87×10^{-5}	5.19×10^{-5}	5.83×10^{-5}
Bax	4.75×10^{-4}	4.91×10^{-4}	2.50×10^{-4}	6.99×10^{-4}
Bcl-xl	0.015	0.020	0.011	0.007
Caspase-3	3.13×10^{-3}	3.44×10^{-3}	3.19×10^{-3}	4.54×10^{-3}
Caspase-9	2.62×10^{-4}	3.31×10^{-4}	2.75×10^{-4}	2.51×10^{-4}

Values were represented by relative gene expression levels compared to house keeping gene (β -actin), calculated with $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Table 5. Effect of Greater Celandine on HSC-T6's Gene Expression after Treated 72 Hours.

gene	concentration	72h-0 $\mu\text{g/ml}$	72h-50 $\mu\text{g/ml}$	72h-150 $\mu\text{g/ml}$	72h-300 $\mu\text{g/ml}$
aSMA		5.36×10^{-5}	1.77×10^{-5}	1.90×10^{-5}	1.71×10^{-5}
TIMP1		0.018	0.016	0.015	0.014
TIMP2		0.032	0.031	0.030	0.022
Collagen Ia1		0.048	0.043	0.038	0.035
PDGFr- β 1		1.78×10^{-3}	0.69×10^{-3}	0.65×10^{-3}	0.63×10^{-3}
MMP-2		2.10×10^{-5}	5.43×10^{-5}	1.01×10^{-4}	1.71×10^{-4}
IL-6		8.42×10^{-7}	9.30×10^{-7}	1.82×10^{-6}	6.42×10^{-6}
TGF- β 1		0.021	0.016	0.029	0.025
Bcl-2		8.00×10^{-5}	10.10×10^{-5}	13.10×10^{-5}	11.30×10^{-5}
Bax		9.57×10^{-4}	10.53×10^{-4}	8.08×10^{-4}	5.84×10^{-4}
Bcl-xl		0.034	0.032	0.033	0.026
Caspase-3		5.05×10^{-3}	5.78×10^{-3}	5.77×10^{-3}	3.24×10^{-3}
Caspase-9		3.71×10^{-4}	4.93×10^{-4}	6.80×10^{-4}	5.13×10^{-4}

Values were represented by relative gene expression levels compared to house keeping gene(β -actin), calculated with $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

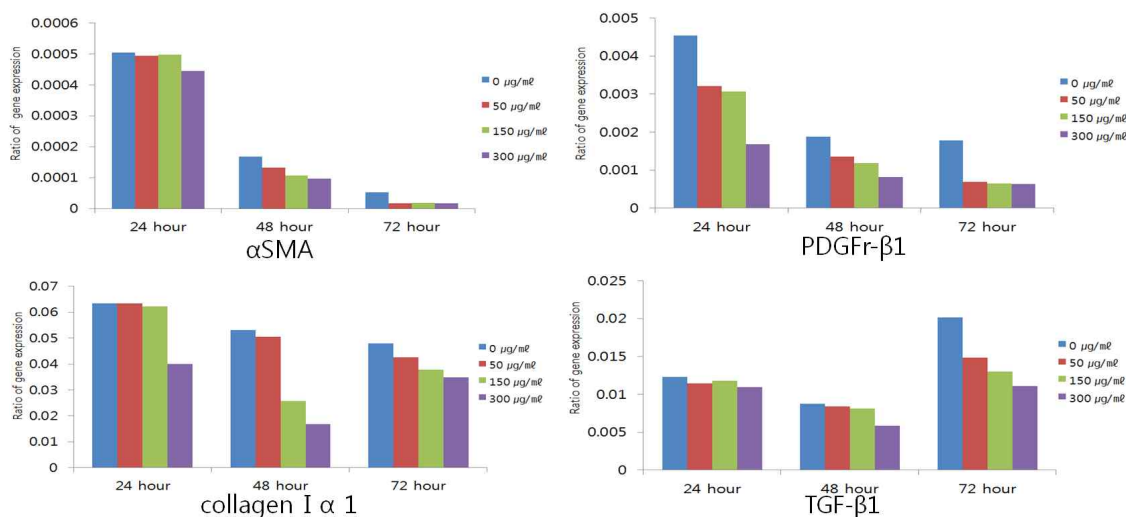


Fig. 3. Effect of greater celandine on HSC-T6's α SMA, PDGFr- β 1, Collagen Ia1, TGF- β 1 mRNA expression assessed by real-time PCR.

白屈菜가 간섬유화 과정 중 간성상세포에 미치는 영향

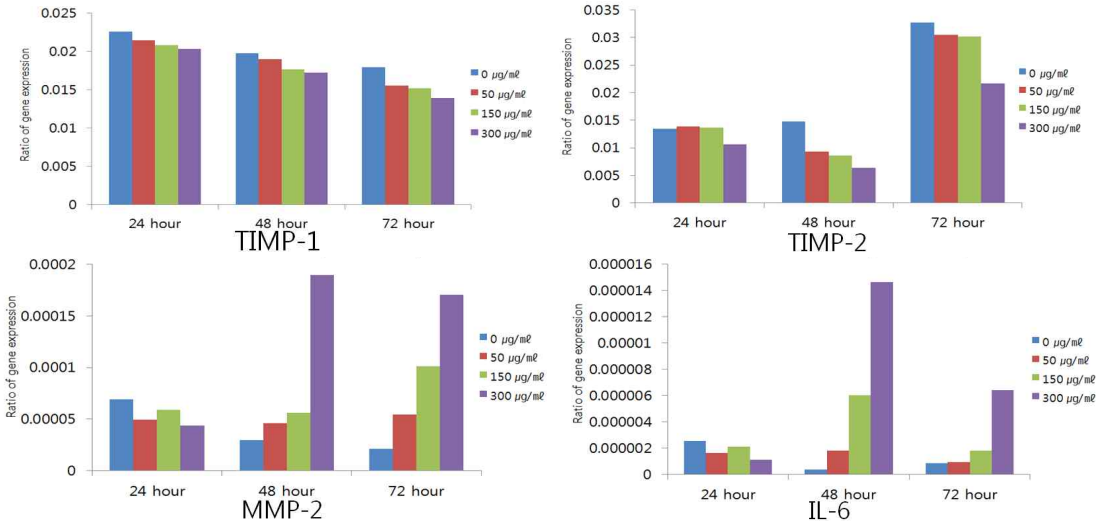


Fig. 4. Effect of greater celandine on HSC-T6's TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, IL-6 mRNA expression assessed by real-time PCR.

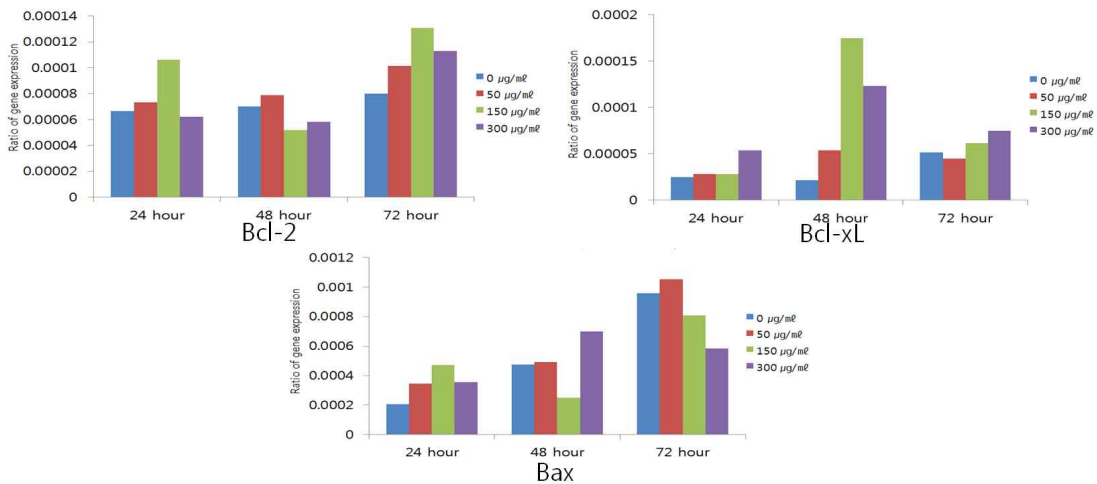


Fig. 5. Effect of *Greater Celandine* on HSC-T6's Bcl-2, Bcl-xL, Bax mRNA expression assessed by real-time PCR.

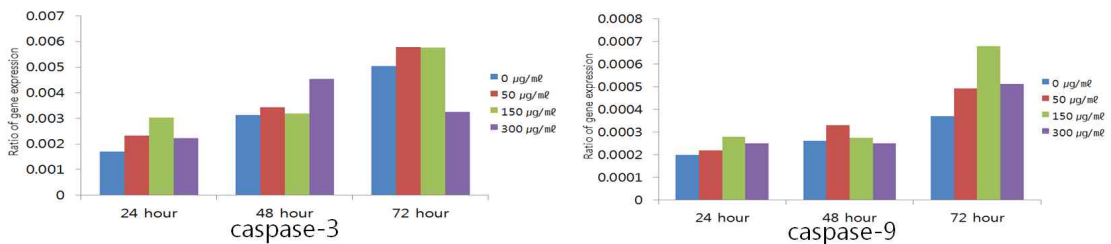


Fig. 6. Effect of *Greater Celandine* on HSC-T6's Caspase-3, Caspase-9 mRNA expression assessed by real-time PCR.

4. 白屈菜가 superoxide dismutase(SOD) 활성에 미치는 영향. 향을 확인하기 위하여 superoxid dismutase assay
 白屈菜가 간성상세포의 SOD 활성에 미치는 영 를 한 결과, 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다
 (Table 6).

Table 6. Effect of *Greater Celandine* on HSC-T6's SOD Activity (SOD Assay).

time(hour) \ concentration	0 $\mu\text{g/ml}$	ethanol only (10mM)	50 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$
24	0.45	0.55	0.52	0.56	0.54
48	2.50	2.43	2.52	2.53	1.39**
72	1.76	1.76	4.24**	3.67**	1.32

Values represent SOD activity (U/ml) converted from the O.D. of each sample using standard curve made with SOD activity standard provided by the company.

P-values compared with the none treated (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

5. 白屈菜가 catalase 활성에 미치는 영향. 향을 확인하기 위하여 catalase assay를 한 결과,
 白屈菜가 간성상세포의 CAT 활성에 미치는 영 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 7).

Table 7. Effect of *Greater Celandine* on HSC-T6's CAT Activity (Catalase Assay).

time(hour) \ concentration	0 $\mu\text{g/ml}$	ethanol only (10 mM)	50 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$
24	2.28	0.64	0.58	0.52	0.94
48	3.76	3.79*	3.76*	2.79	3.61*
72	10.44	11.66	10.63**	10.35*	4.34

Values represent CAT activity (nmol/min/ml) converted from the O.D. of each sample using standard curve made with Formaldehyde standard provided by the company.

P-values compared with the none treated (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

IV. 고 찰

최근 발표된 통계에 의하면 한국에서 간질환에 의한 사망자수가 6888명으로 사망률은 십만명당 13.8명으로 나타나고 있다. 그중 간 섬유증/간경화에 의한 사망자수가 2606명으로 사망률은 10만명당 5.2명이었으며, 특히 40대 이상에서 사망률이 현저히 높은 것으로 나타났다¹².

간섬유화는 collagen을 포함하여 비정상적인 세포외기질 단백질이 축적되는 것이다. 그 중요기전은 간성상세포의 활성화인데 만성 간질환을 일으키는

심한 손상의 결과로 활성화된 간 성상세포가 증식을 동반하면서 다양한 세포외기질 물질을 합성하고 분비하여 축적되는 것이다²⁻⁴.

간성상세포는 활성화 되면 αSMA , TIMP-1, TIMP-2, collagen I α 1, PDGFr- β , TGF- β 1을 발현하며, 콜라겐 I형, III형, IV형, fibronectin, laminin, proteoglycan 등 대부분의 세포외기질 구성 단백을 합성하고 분비하는 특징을 보인다^{13,14,15}. 간섬유화가 회복될 때에는 collagen I α 1의 콜라겐 합성이 억제됨과 동시에 제I형 콜라겐을 분해하는 MMP의 출현이 지속되면서 MMP의 발현을 방해하는

TIMP-1의 발현이 감소함으로 인해 MMP의 활성화는 증가하게 되고, 간성상세포의 활성이 억제되면서 부분적인 회복을 보인다¹⁶.

한의학에서는 이미 오래 전부터 급, 만성 간질환으로부터 간경변증, 간암으로의 전변과정을 증후론적으로 잘 관찰하여 왔다^{17,18}. 또한 간질환에 투여되는 한약물의 간세포 보호와 간기능 개선¹⁹⁻²¹뿐만 아니라 간경변증의 진행과 관련된 collagen의 합성을 억제하는 효과에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다^{22,23}. 한약물이 간경변증에 미치는 영향에 대한 기존의 연구는 물리적 또는 화학적 방법을 통해 간독성을 야기하거나 혹은 간경변증을 유발시킨 동물모델을 대상으로 한 것²⁴, 간암세포주를 이용한 것²⁵, 간성상세포를 포함한 비실질세포의 1차배양세포를 통한 collagen의 합성에 미치는 효과에 관한 것²⁶ 등이 있다. 최근에는 간섬유화의 진행과 관련된 기전이 간성상세포의 활성화와 증식, 세포외기질 특히 콜라겐의 합성과 과도한 분비 등에 기초한다는 사실에 집중하여 인진, 단삼 등 한약재가 간성상세포에 미치는 효과에 대한 연구도 많이 진행되고 있다^{27,28}.

白屈菜는 山黃連, 土黃連, 牛金花, 斷腸草 등 異名을 갖고 있는 多年生 草本인 애기똥풀의 全草이다. 味苦寒 小毒하고 胃, 大腸, 肺를 귀경으로 하며 清熱解毒, 止痛, 止咳 功效가 있어 胃炎, 胃潰瘍, 腹痛, 腸炎, 痢疾, 黃疸, 百日咳 등 질병에 사용되고 있다^{29,30}. 기존 연구에서 白屈菜는 항염증, 항종양, 항균, 항바이러스, 항미생물, 진통 등의 작용이 있음이 보고되었고⁶⁻⁸, 최근에는 자궁경부의 암세포 HeLa cell에 대한 사멸을 일으킨다는 연구도 보고되었다³¹. 반면에 白屈菜는 변비, 담낭, 결석, 위상복부 통증, 아토피성 습진, 소화불량, 등의 부작용을 유발할 수 있음⁹도 보고된 바 있어서 임상에서 白屈菜를 사용할 때에는 투여량을 신중히 조절하여야 한다. 중의학 임상에서도 위장 통증, 수종, 황달, 간경화복수, 백일해, 만성기관지염 등 질환에 사용되고 있는데¹⁰ 이러한 내용을 볼 때 간질환에

사용할 수 있을 것으로 여겨지지만, 한국의 한의학 임상에서는 白屈菜를 간질환에 투여하거나 실험적으로 간질환과 관련된 효능을 검증한 예는 없는 상황이다. 이러한 白屈菜의 임상적 효용을 고려할 때, 간섬유화 과정에서 간성상세포에 대한 억제 작용이 기대되었다. 따라서 본 연구에서는 간성상세포를 이용하여 白屈菜가 간성상세포의 활성화와 증식, 유전자 발현, 항산화효소의 활성화에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

白屈菜가 간성상세포의 활성화에 미치는 효과를 살펴보기 위하여 MTT assay를 시행하였다. MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의하여 자주색의 formazan으로 변화된다³². 이런 원리에 기초하여 비색분석을 통하여 세포의 활성의 측정하는 것이다. Assay를 시행한 결과 屈菜는 간성상세포의 활성을 농도 의존적으로 억제하였다(Table 1, Fig. 1).

白屈菜가 간성상세포의 증식에 미치는 효과를 보기 위하여 BrdU assay를 시행하였다. BrdU는 thymidine과 비슷한 구조의 물질로 세포 증식 과정에서 DNA 합성시기에 thymidine을 대체하여 DNA를 합성하는 것이다^{33,34}. 세포속의 BrdU는 특정된 anti-BrdU 형광항체와 반응하여 초록색을 띄게 된다. 이런 원리에 기초하여 비색분석을 통하여 세포의 증식능력을 측정하는 것이다. Assay를 시행한 결과 白屈菜는 간성상세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다(Table 2, Fig. 2).

RT-PCR 검사에서는 白屈菜를 농도별, 시간별로 처리하여 α SMA, TIMP-1, TIMP-2, collagen I α 1, PDGFr- β , TGF- β 1, MMP-2, IL-6, Bcl-2, Bcl-xl, Bax, caspase-3, caspase-9 등의 유전자의 발현을 관찰하였다.

Alpha-SMA는 주로 자가면역성간염의 진행과 관련이 있으며 감염성질환, 염증성腸질환, 심근염, 급성간염과도 관련이 있다. 간성상세포는 비활성화 상태에서는 smooth muscle actin의 발현이 거의 없다가 세포가 활성화 되면서 증가하게 되는데, 白屈菜로 인한 α SMA의 농도의존적인 감소는 간성상세

포의 활성화 단계를 억제하는 효능이 있음을 시사하는 것으로 사료된다.

TIMPs(TIMP-1, TIMP-2)는 MMPs의 작용을 억제하는 단백질이다. TIMPs의 감소로 MMP의 활성이 증가하면서 간성상세포의 분해가 활발해진다. 본 연구에서 白屈菜의 투여는 TIMP-1과 TIMP-2 유전자 발현을 농도에 비례하여 억제하는 것으로 나타났는데, 이는 MMP의 발현이 항진됨을 의미하며 따라서 세포외기질이 분해되고 간섬유화의 진행이 억제됨을 의미하는 것으로 사료된다.

Type-1 collagen은 은 인체에 가장 풍부한 콜라겐이다. 이는 조직 회복으로 인한 흉터조직에 존재하며 건(腱)에도 존재한다. Collagen Ia1은 type-1 collagen의 주요 요소로서 대부분의 결합조직에서 존재하는 미소 섬유 콜라겐이다. 간섬유화시 관찰되는 주된 인자인 collagen Ia1의 白屈菜에 의한 농도의존적인 감소는 白屈菜가 간섬유화의 진행에 대한 억제효과가 있음을 나타낸다.

PDGF는 간장이 손상 받을 때 대식세포, 혈소판, 침윤된 염증세포, 손상된 내피세포, 활성화된 성상세포에 의해 분비되는 하나의 중요한 유사분열 촉진인자로 특정된 세포군을 자극하여 유사분열에 의한 세포증식을 촉진시킨다. PDGFR는 간성상세포의 세포표면에서 발현되며 유전자의 발현 정도는 간성상세포의 증식과 관련이 있으며, 간성상세포는 활성화됨과 동시에 PDGF를 분비하고 분비된 PDGF를 자체적으로 보유한 수용체에 결합하여 다시금 활성화되는 과정을 거치게 된다. 본 연구에서 白屈菜를 투여한 후 PDGFR의 유전자 발현이 농도의존적인 감소를 관찰할 수 있었고 이는 백굴채의 투여로 간성상세포의 증식이 억제됨을 시사하는 것으로 사료된다.

TGF-β는 여러 가지 세포의 성장, 분화, 세포사멸 및 면역조절 기능에 영향을 미치는데 세포분화가 활발한 조직에 비교적 많이 포함 되어 있다. 또한 거의 모든 종양세포 내에서 TGF-β mRNA가 검출 된다. 정상적인 세포에서는 세포주기 G1 단

계에 머물게 하여 세포사멸을 억제하지만 암세포로 변이된 후 세포증식을 촉진시킨다³⁵. TGF-β는 간성상세포에서 fibrogenesis를 촉진하는 cytokine으로 작용을 하는데¹, 간성상세포가 활성화될 때 TGF-β의 발현도 증가하게 되는데, 白屈菜에 의한 TGF-β mRNA 발현의 농도의존적인 감소는 간성상세포의 세포외기질 합성의 감소를 의미하는 것으로 사료된다.

MMPs는 ECM속의 여러 가지 단백질을 분해하는 효소로 그중 MMP-2는 주로 기저막의 주요구조를 이룬 IV형 콜라겐을 분해하는 것이다. 본 연구에서 白屈菜를 투여하였을 때 MMP-2의 증가는 과도하게 형성된 콜라겐을 분해하는 역할을 하게 되고, 따라서 간섬유화의 진행이 억제될 것으로 사료된다.

IL-6는 T cell, 대식세포 등에 의하여 분비되며, 면역반응이 활발하게 일어날 때 발현되는 것으로, 염증반응이 진행되어 있음을 의미하기도 하고 염증반응을 억제하는 반응으로 나타나는 것으로 이해하고 있기도 한다. 이를 고려할 때 白屈菜에 의한 농도의존적인 증가는 면역반응이 활발하게 진행되면서 염증반응이 억제되는 과정 중에 나타나는 현상으로 파악할 수 있고, 결과적으로 손상으로 인한 간섬유화의 진행이 억제되는 상태인 것으로 생각된다.

白屈菜의 투여가 간성상세포의 활성화와 증식을 억제하고 섬유화 관련 유전자의 발현을 감소시키는 것이 apoptosis와 관련이 있는지를 살펴보기 위하여 세포사멸에 관련된 유전자 Bcl-2, Bax, Bcl-xL, caspase-3, caspase-9 등의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 白屈菜의 투여에 의한 세포사멸 관련 유전자 발현에는 투여 농도나 시간에 의존적인 일관성 있는 결과는 관찰할 수 없었다. 따라서 白屈菜가 가지는 간성상세포의 섬유화 관련 유전자 발현 억제 효과에는 세포사멸 이외의 기전이 작용할 것으로 사료된다(Table 3-5, Fig. 3-6).

白屈菜를 투여하였을 때 활성화된 간성상세포의

과피를 억제하는 항산화 작용이 있는지를 측정하기 위하여 SOD, catalase assay를 시행하였다. SOD는 과산화음이온이 과산화수소와 산소분자로 환원되는 과정에 촉매 작용을 하는 금속효소이다. 그리하여 과산화음이온으로 인한 산화스트레스로부터 세포를 보호하는데 결정적인 방어기제 역할을 한다³⁶. Tetrazolium salt는 과산화음이온을 산소로 산화시키면서 formazan dye로 변한다. 이 과정에서 짙은 청색으로부터 심홍색으로 색깔의 변화가 일어난다. 여기에 기초하여 비색분석을 통하여 SOD 활성도를 측정하는 것이다.

Catalase(CAT)는 대다수의 aerobic cell이 함유하고 있는 매우 흔한 항산화 효소이다. CAT는 과산화수소가 물과 산소로 분해되는 과정에서 촉매 작용을 한다³⁷. 그리하여 과산화수소로부터 받는 세포의 산화스트레스를 감소시켜주는 것이다. 이 원리에 기초하여 4-amino-3hydrazino-5-mecapto-1,2,4-triazole(purple)를 색원체로 사용하여 색깔의 변화를 측정하여 CAT 활성을 측정하는 것이다. 분석한 결과 白屈菜를 투여하였을 때 SOD가 72시간 투여군에서 상승되는 것과, catalase가 24시간 투여군에서 약간의 감소를 보였을 뿐, 다른 모든 시간별 및 농도별 투여군에서는 의미 있는 변화가 관찰되지 못하였다. 이는 이미 보고된 SOD, CAT 활성 측정에 관한 타 연구들과 비교할 때, 산화스트레스를 준 세포나 기관에서 약재 처리로 인하여 SOD, CAT의 활성이 증가되는 양상³⁸⁻⁴⁰이 나타나는 것과는 다른 결과가 나타났다. 이는 백굴채가 적어도 활성화된 간성상세포를 산화스트레스로부터 보호하는 작용은 없을 것으로 사료되는 결과이며, 따라서 백굴채를 투여하여도 활성화된 간성상세포를 유지하는 원치 않는 반응은 없이 다른 기전을 통한 간섬유화 억제효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다(Table 6, 7).

이상의 결과들을 종합하여 고려 할 때, 白屈菜는 간성상세포의 활성, 증식, collagen의 합성, 염증반응을 억제하고, 병리적인 collagen의 분해를 촉진시

킴으로 간섬유화의 진행을 억제하는 것으로 판단되었다. 그러나 많은 한약재들이 항산화효과를 가지는 것에 비하여, 白屈菜는 활성화 상태의 간성상세포에 대하여는 보호 작용을 가지지 않으며, 동시에 白屈菜의 간섬유화 억제 효과가 간성상세포의 apoptosis 유도와는 관련이 없는 것으로 사료되었다.

향후 白屈菜가 가지는 간섬유화 억제효과에 대한 보다 자세한 작용기전, 투여시의 적정농도 및 기존 치료처방들과의 병용에 의한 치료효과 등에 대하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

白屈菜가 간성상세포의 세포활성과 증식능력, collagen 합성 및 세포의 기질의 분해, apoptosis 등과 관련된 유전자 발현, 항산화 효소의 활성 등에 미치는 영향을 관찰하고자 rat의 간 성상세포에 약물을 처리한 후 MTT assay, BrdU assay, RT-PCR 및 SOD assay, catalase assay를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 白屈菜는 농도의존 적으로 간성상세포 활성을 억제하였다.
2. 白屈菜는 농도의존 적으로 간성상세포의 증식을 억제하였다.
3. 白屈菜는 α SMA, TIMP-1, TIMP-2, collagen I α 1, PDGFr- β , TGF- β 1 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다.
4. 白屈菜를 장시간 투여하였을 때 MMP-2, IL-6 유전자 발현이 농도 의존적으로 증가되었다.
5. 白屈菜는 Bcl-2, Bax, Bcl-xL, caspase-3, caspase-9 등의 유전자 발현에 대해서는 유의성 있는 변화를 일으키지 못했다.
6. 白屈菜를 투여하였을 때, 활성화된 간성상세포를 산화스트레스로부터 보호하는 효과는 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서, 白屈菜는 간성상세포의 활성화, 증식, collagen의 합성, 염증반응을 억제하고, 병리적 collagen의 분해를 촉진시켜서 간섬유화의 진행을 억제하는 것으로 판단되었다. 향후 작용기전 및 임상에서 활용시의 적절한 투여 농도에 대하여는 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38:S38-S53.
- Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1(2):98-105.
- Friedman SL. Hepatic Fibrosis-Overview. *J Toxicology* 2008;254:120-9.
- Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134(6):1655-99.
- Tutin TG, Burges NA, Chater AO, Edmondson JR, Heywood VH, Moore DM, et al. Flora Europea (Volume I). Cambridge University Press; 1964, p. 247-51.
- Colombo ML, Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). *Pharmacol Res* 1996;33(2):127-34.
- Wei ZQ, Qu XQ, Zhong Y, Ji YB. Celandin chemical constituents and pharmacological research progress. *Chin Tradit Herb Drugs* 2009;40:38-40.
- Gilca M, Gaman L, Panait E, Stoian I, Atanasiu V. *Chelidonium majus*-an Integrative Review: Traditional Knowledge versus Modern Findings. *Forsch Komplementmed* 2010;17:241-8.
- 曁王烈. 백굴채와 복합방이 소아과 임상에서의 응용을 논하다. 전국 제26계 중의소아과 학술회曁王烈교수 학술사상 심포지엄 논문집 2009:30-6.
- Moro PA, Casseti F, Giugliano G, Falce MT, Mazzanti G, Menniti-Ippolito F, et al. Hepatitis from Greater celandine(*Chelidonium majus* L.): Review of literature and report of a new case. *J Ethnopharmacol* 2009;124:328-32.
- 식약청. 대한약전의 한약규격집. 서울: 1985.
- 통계청 사회통계국 인구동향과. 2009년 사망원인통계 결과 [internet]. 통계청:2010. [2010.10.25 검색]. Available from: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/6/2/index.board?bmode=read&aSeq=179505.
- Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induced collagen type1 expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:987-96.
- Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatology* 1998;29:836-47.
- Gressner AM. Cytokines and cellular cross talk involved in the activation of fat storing cells. *J Hepatol* 1995;22:28-36.
- Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004;126(7):1795-808.
- 장중경. 금계요략. 서울: 행림서원; 1984, p. 32-4.
- 전국 간계내과학 교수 일동. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001, p. 323-50.
- 우홍정. 만성 B형 간염에 대한 茵陳清肝湯의 효과. 제2회 한중학술대회(간장병)논문집. 대한한의사협회; 1995, p. 18-53.
- 이장훈. 三七生肝湯의 效能에 關한 實驗的 研究. 慶熙韓醫大論文集 1994;17(2):17-39.
- 박상백, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 DMN 유발 간섬유화 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(1):200-18.
- 김지권, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이

- kupper cell의 inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(1):46-58.
23. 이지현, 이장훈, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 TGF- β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2005;26(1):93-106.
 24. 강병기, 홍석의, 六鬱湯 및 散鬱湯이 DMN 및 담도결찰로 유발된 간경변증에 미치는 영향. 제2회 한중학술대회(간장병)논문집. 대한한의사협회; 1995, p. 91-122.
 25. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳이 TGF- β 1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(3):141-55.
 26. 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳淸肝湯이 흰쥐의 간조직에서 비실질세포의 procollagen 합성억제에 미치는 효과에 관한 연구. 대한한방내과학회지 2003;24(4):817-25.
 27. 김성아, 우홍정, 김영철, 이장훈. 茵陳이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(1):177-88.
 28. 최은경, 이장훈, 김영철, 우홍정. 丹蔘이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(2):299-310.
 29. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典. 上海科學技術出版社; 1978, p. 726-7.
 30. 한중현, 신민교, 박호식. 백굴채(白屈菜)의 약리작용에 관한 연구. 대한한의학회지 1985;6(2):128-33.
 31. Nawrot R, Wolun-Cholewa M, Gozdicka-jozefiak A. Nucleases isolated from chelidonium majus L. milky sap can induce apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells but not in Chinese Hamster Ovary CHO cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(1):79-83.
 32. Mosmann T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
 33. Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, Lehner C, Furtner T, Couillard-Despres S, et al. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: Detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res* 2011;345(3):313-28.
 34. Konishi T, Takeyasu A, Natsume T, Furusawa Y, Hieda K. Visualization of Heavy Ion Tracks by Labeling 3'-OH Termini of Induced DNA Strand Breaks. *J Radiat Res* 2011;52(4):433-40.
 35. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
 36. Malstrom B, Andreasson L, Reinhammer B. In: Boyer P., editor. The Enzymes, XIIB. 3rd edition. New York: Academic Press; 1975, p. 533.
 37. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(2):192-208.
 38. Jia YG, Tong Y, Xiang GS, Ni YZ, Fu SL, Dan L, et al. Ischemic postconditioning attenuates liver warm ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS-NO-HIF pathway. *J Biomed Sci* 2011;18:79.
 39. Kumar S, Gupta S. Thymosin Beta 4 prevents oxidative stress by targeting antioxidant and anti-apoptotic genes in cardiac fibroblasts. *PLoS One* 2011;6(10):e26912.
 40. Liu XQ, Li KF, Du J, Li J, Li R. Growth rate, catalase and superoxide dismutase activities in rock carp (*Procypris rabaudi* Tchang) exposed to supersaturated total dissolved gas. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12(11):909-14.