

茵陳清肝湯이 간성상세포의 세포성장과 사멸에 미치는 영향

김상주, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The effects of *Injinchunggan-tang* on Cell Growth and Apoptosis in Human Hepatic Stellate Cell Line LX2

Sang-joo Kim, Hong-jung Woo
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate the effects of *Injinchunggan-tang* on cell growth and apoptosis in human hepatic stellate cell line LX2.

Materials and Methods : Hepatic stellate cells were treated with various concentrations of *Injinchunggan-tang* extract for 24, 48 and 72 hours. The extraction was done with distilled water. After the treatment, cell viability, proliferation, apoptosis, caspase activity, caspase inhibitor and the mRNA of the Bcl-2, and Bax with β -actin were measured by using MTT assay, apoptosis assay and RT-PCR.

Results : Proliferation, and mRNA expression of the hepatic stellate cells were inhibited by *Injinchunggan-tang* treatment in a dose-dependent manner. This indicates the prescription has inhibitory effect on fibrogenesis of the liver by regulating the fibrogenesis-associated genes in transcription. Cell viability was inhibited in time- and dose-dependent manners.

Conclusions : These results suggest that *Injinchunggan-tang* would be beneficial in the treatment of cirrhotic patients as well as for the patients with chronic hepatitis.

Key words : *Injinchunggan-tang* (*Yinchenqinggan-tang*), human hepatic stellate cells LX2, apoptosis, caspase inhibitor

1. 緒 論

2010년 통계청에서 발표한 대한민국 사망원인통계에 의하면 사망원인 순위에 있어 간질환에 의한 사망이 8위를 차지하고 있으며 성별 사망원인 순위를 살펴보면 남성의 경우 5위 여성의 경우 10위를 차지하고 있다. 그 중에서도 간섬유화 및 간경화에 의한 사망이 알코올성 간질환에 이어 2위를

차지하고 있다¹.

간섬유화는 만성 간내 염증으로 인한 세포외 기질의 과도한 침착으로 정의될 수 있으며 이러한 세포외 기질의 과도한 침착으로 만성간질환이 지속되는 경우 결국은 간내 구조의 변형과 간세포수의 감소로 간경변증으로 진행되게 된다. 간섬유화에 관여하는 대표적인 세포로는 간성상세포, Kupffer cell, 내피세포 등이 있다. 그 중 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)는 자극을 받으면 활성화하고 증가하며, 콜라겐을 포함한 다양한 세포외기질 물질을 합성하고 분비하게 되며, 이렇게 간소엽 전체에 광범위하게 축적된 콜라겐은 혈류의 흐름과 간세

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

포의 물질교환 등을 방해하게 되어 섬유화를 진행 시키게 된다².

茵陳清肝湯은 淸熱利濕 시키는 茵陳四苓散에 地榆 覆盆子 蘿菘子 靑皮 등을 가미한 처방으로³ 안전성 시험과 간질환의 임상 효과에 대한 검증을 거쳐 임상에서 급만성 간질환의 치료에 폭넓게 사용되고 있다.

茵陳清肝湯은 임상연구에서 만성 B형간염 환자의 손상된 간 기능의 개선⁴, 실험적 연구에서 급성 및 아급성, 만성 경구독성실험에서 약물의 안전성⁵, fibroblast의 증식과 섬유화 유발 유전자 발현에 대한 억제⁶, Kupffer cell에서의 inflammatory cytokine 발현에 대한 억제⁷, CCL₄로 간경변증을 유발한 흰 쥐에 대하여 간기능회복 및 간조직의 섬유화 억제 작용이 뚜렷함⁸ 등의 보고가 있었다.

이에 저자는 간성상세포에 茵陳清肝湯을 처리하여 MTT assay, cell cycle analysis, apoptosis assay, caspase-3 protease activity, caspase inhibitor assay 그리고 RT-PCR을 시행하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 方法

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해⁹에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Injinchunggan-tang* (JCGT).

韓藥名	生藥名	用量 (g)
茵 陳	Artemisiae Capillaris Herba	50
地 榆	Sanguisorbae Radix	15
白 朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	12
茯 苓	Hoelen	12
豬 苓	Polyporus	12
覆盆子	Rubi Fructus	12
生 薑	Zingiberis Rhizoma	12
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	8
蘿菘子	Raphani Semen	8
靑 皮	Aurantii Pericarpium	6
甘 草	Glycyrrhizae Radix	6
Total		153

2) 검액의 조제

총 시료(153 g)를 3차 증류수(4.8 L)로 2시간 동안 전탕하였다. 이를 상온에서 식힌 후 Whatman filter paper로 여과하여 감압 농축하고, 동결건조기를 이용하여 17.65 g의 건조추출물(수율 11.54%)을 얻었다. 얻어진 동결건조 엑기스는 사용할 때까지 vacuum container에 4 °C 상태로 보관하였다.

3) 시 약

FBS, DMEM, Antibiotics 등은 Gibco사(CA, USA), n-Propanol, MTT 등은 Sigma사(MO, USA), caspase colorimetric protease assay sampler kit(BioVision, Mountain View, CA, USA), RNA-Bee solution kit, RT-PCR System은 Promega사(WI, USA) 등의 제품을 사용하였고, 기타 plastic wares는 SPL 사(Korea)제품을 이용하였다.

2. 방 법

1) 세포 배양(Cell culture)

인간 간성상세포인 LX2(kind gift of Dr. Scott L. Friedman)를 사용하였다. 1% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 그리고 100 μ g/mL streptomycin 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 37

℃, 5% CO₂로 배양하였다.

2) 세포활성 측정(MTT assay)

LX2 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well씩 분주하여 여러 농도(50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$)로 약제를 처리하고 37 °C에서 24, 48 그리고 72 시간 별로 MTT assay를 하였다. 세포 생존율은 PMS/MTS solution을 이용하여 측정했다. 흡광도는 650 nm 참조파장에서 492 nm로 측정되었다.

3) Cell cycle analysis

인진청간탕이 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 cell cycle analysis를 시행하였다. 먼저, 6-well plate에 5×10^5 cells를 분주하고 인진청간탕을 농도별로 처리하고 24시간동안 incubate한 뒤 약제가 처리된 세포를 trypsin을 이용하여 회수하고 PBS로 씻었다. 얻어진 cell을 0.3 ml의 PBS에 섞은 뒤 차가운 100% ethanol 0.7 ml를 넣고 4 °C에 보관했다. 그리고 10 μl RNase A를 넣고 37 °C에서 1시간동안 배양한 뒤 20 μl 의 propidium iodide로 염색하고 FACScalibur(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)를 사용하여 DNA성분을 측정한 다음, Modifit cell cycle analysis software(Verity Software House, Topsham, ME, USA)를 사용하여 분석하였다.

4) Apoptosis assay

LX2 세포의 세포사멸을 밝히기 위해, 사멸세포의 정량은 cell death detection ELISAplus(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 측정되었다. 먼저 96-well plate에 각 well 당 1×10^4 개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 0 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 인진청간탕을 처리하고 24시간 동안 배양했다. 배양 후 well 당 0.2 ml(1×10^4 개의 세포)의 lysis buffer를 실온에서 30분간 처리하여 세포를 회수하였으며, 이렇게 얻은 lysate은 10분간 $200 \times g$ 에서 원심 분리되었다. 20 μl 세포용해물 안의 사멸세포들은 제조사의 지시에 따라 ELISA kit를 이용하여 DNA 분절화를 분

석하였으며 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

5) Measurement of caspase-3 protease activity

Caspase-3의 효소활성은 caspase colorimetric protease assay sampler kit(BioVision, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. LX2 세포를 100 mm culture dish에 2×10^6 cells/mL의 농도로 분주하고 인진청간탕 500 $\mu\text{g/mL}$ 를 각각 0, 6, 24, 48 시간 배양했다. 이후 세포에 trypsin을 처리하여 회수하고 50 μl 의 lysis buffer를 첨가하여 얼음 위에 10분간 방치한 후, $12,000 \times g$ 에서 1분간 원심분리 되었다. 그 상층액을 얻어서 BCA protein assay(Pierce, Rockford, USA) 방법으로 농도를 측정했다. 그런 다음 caspase-3 substrate를 cell lysate에 첨가하고 37 °C의 암실에서 2시간 동안 배양한 후 흡광도 405 nm에서 microplate reader로 측정했다.

6) Caspase inhibitor assay

LX2 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주했다. 2시간 동안 여러 농도의 pan-caspase inhibitor, Z-VAD-FMK, 또는 caspase-3-specific inhibitor, Z-DEVD-FMK를 전 처리한 후에 500 $\mu\text{g/mL}$ 인진청간탕을 첨가해 24시간 배양시켰다. 세포 생존율은 PMS/MTS solution을 이용하여 측정했다. 흡광도는 650 nm 참조파장에서 492nm로 측정되었다.

7) RT-PCR

(1) RNA 추출

6-well plate에 LX2 세포를 분주하고 다음 날 각 plate에 0 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 약제를 처리한 후 12시간, 24시간, 48시간별로 RNA-Bee solution kit를 이용하여 RNA를 분리하였다.

(2) Complementary DNA(cDNA) 합성

Promega사의 Reverse Transcriptase System을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 1 μg 의 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, pH 9.0, 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, Medison, WI, USA)를 가하여 최종량을 20 μl로 하였다. 반응조건은 42 °C에서 1시간, 95 °C에서 5분간, 4 °C에서 5분간으로 하여 반응시켰다. 합성된 cDNA는 -80 °C에서 보관하였으며 필요할 때마다 꺼내서 사용하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene 으로는 β-actin(5'-CTTC TACAATGAGCTGCGTG-3' and 5'-TCATGAGG TAGTCAGTCAGG-3')을 사용하였고, target gene 으로는 Bcl-2(5'-CTTTGAGTTCCGGTGGGGTCATGTG-3' and 5'-TGACTTCACATTGTGGCCCAGATAGG-3') 와 Bax(5'-GCATCGGGGACGAAGTGG-3' and 5'-GTCCCAAAGTAGGAGAGGA-3')를 사용하였다.

(4) RT-PCR

PCR의 방법은 2 μl의 cDNA에 10 μl의 SsoFast™ EvaGreen® supermix(Bio-Rad), 2 μl의 primers, 6 μl의 PCR-grade water를 넣고 총 volume이 20 μl 가 되도록 조정하였다. PCR 조건은 유전자 증폭기 (Biometra, Göttingen, Germany)를 이용하여 초기 변성(denaturation)은 95 °C로 30초간 시행한 후 95 °C에서 5초간, 55~58 °C 사이에서 12초간 45 cycles 로 시행하였다. 유전자의 발현정도는 β-actin을 기준으로 발현된 유전자의 상대적인 값을 정량적으로 표현하였다.

8) 통계처리

통계처리는 Microsoft사의 Excel program을 이용하여 Student's T-test를 수행하였으며, p<0.05인 경우를 유의성이 있다고 하였다.

III. 結果

1. 인진청간탕이 간성상세포 세포활성에 미치는 영향

인진청간탕이 LX2 세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 시간별(24시간, 48시간, 72시간), 농도별(50, 100, 250, 500 μg/ml)로 처리한 결과 세포 활성화도의 감소 경향이 농도 및 시간에 비례하여 유의성 있게 나타났다. 특히 72시간 대, 500 μg/ml에서 활성화도의 억제가 뚜렷했다. 데이터 수치는 정상을 100%로 환산하여 상대적인 수치로 표시했다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effects of IJCGT on Cell Proliferation of LX2 Cells.

	0	50 μg/ml	100 μg/ml	250 μg/ml	500 μg/ml
24 h 100		99.83 ±2.80	98.00 ±1.60	97.40 ±1.56	81.66 ±3.31*
48 h 100		94.70 ±0.52**	94.20 ±1.01*	67.13 ±1.15**	57.46 ±1.06**
72 h 100		90.90 ±1.21**	74.06 ±2.35**	42.76 ±0.45**	41.90 ±0.65**

Values represent mean ± standard deviations. *: Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test (p<0.05). **: (p<0.01)

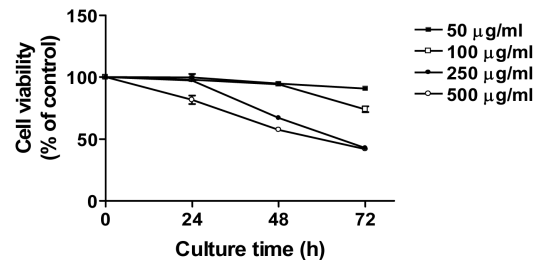


Fig. 1. Effects of IJCGT on cell proliferation of LX2 cells.

LX2 cells were treated with various concentrations of IJCGT (0 - 500 μg/ml) for 24, 48, and 72 h. Cell viability was determined by the MTT assay. The data represent the mean ± standard deviations of triplicate samples. *p<0.05 and **p<0.01 compared to control.

2. 인진청간탕이 간성상세포의 세포주기에 미치는 영향

약제를 처리하지 않은 control군에서는 apoptosis

2.6%, G0/G1 phase에서 43.0%, 인진청간탕 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 apoptosis 5.6%, G0/G1 phase에서 35.1%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 apoptosis 6.7%, G0/G1 phase에서 34.3%, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 apoptosis 14.5%, G0/G1 phase에서 25.2%, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 apoptosis 16.4% G0/G1 phase에서 29.9%를 나타내었다. 따라서 인진청간탕의 간성상세포의 세포주기 분석에서 세포분열과정을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 2).

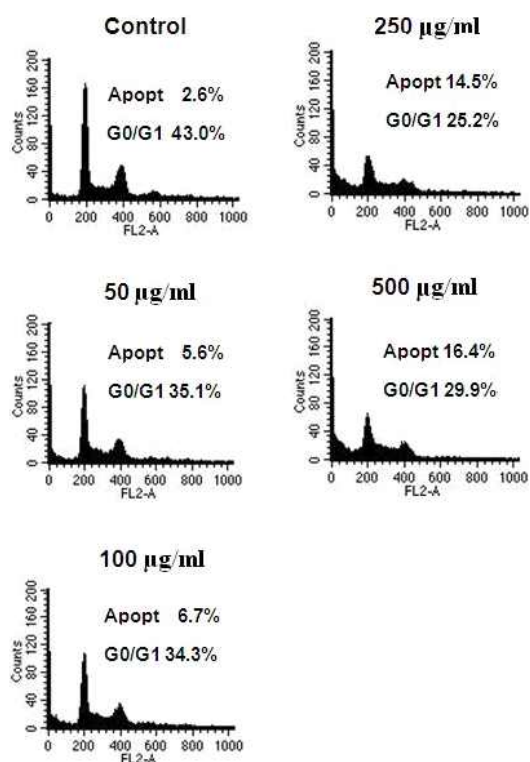


Fig. 2. Effects of IJCGT on cell cycle progression in LX2 cells.

LX2 cells were cultured with various concentrations of IJCGT (0 - 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. Cells were harvested, treated with RNAsin and stained with propidium iodide. The DNA content was analyzed by flow cytometry. The indicated percentages are of the cells in apoptosis and G0/G1 phases.

3. 인진청간탕이 간성상세포의 세포사멸에 미치는 영향

인진청간탕의 농도별 세포사멸 효과를 살펴보면 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 121.00 \pm 8.51%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 154.30 \pm 7.23%, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 362.16 \pm 21.20%, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 436.20 \pm 38.23% 로 측정되었다. 데이터 수치는 control군을 100%로 환산하여 상대적인 수치로 표시했다. 농도 증가에 따라 세포사멸 효과가 커지는 것이 관찰된다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effects of IJCGT on the Apoptosis in LX2 Cells.

Concentration	0	50	100	250	500
		$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$
Apoptosis	100	121.00 \pm 8.51	154.30 \pm 7.23**	362.16 \pm 21.20**	436.20 \pm 38.23**

Values represent mean \pm standard deviations.

*: Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test ($p < 0.05$) ** : ($p < 0.01$)

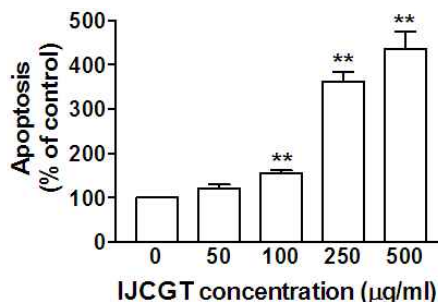


Fig. 3. Effects of IJCGT on the apoptosis in LX2 cells.

LX2 cells were cultured with various concentrations of IJCGT (0 - 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. Apoptotic cells were measured using a cell death detection ELISA. The data represent the mean \pm standard deviations of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to control.

4. 인진청간탕이 caspase-3 활성도에 미치는 영향

배양시간의 증가와 농도의 증가에 따라 caspase-3 활성을 증가시킨다. 특히 24, 48시간 대, 250, 500

μg/ml에서 활성도의 증가가 뚜렷했다. 데이터 수치는 control군을 100%로 환산하여 상대적인 수치로 표시했다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Effects of IJCGT on the Caspase-3 Activation in LX2 Cells.

time	0	6 h	12 h	24 h	48 h
	100	102.23±2.26	107.12±7.51	139.13±4.11*	201.34±3.59**
concentration	0	50 μg/ml	100 μg/ml	250 μg/ml	500 μg/ml
	100	101.12±0.51	119.23±3.69	170.03±8.48*	204.17±8.89*

Values represent mean ± standard deviations. * : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test (p<0.05). ** : (p<0.01)

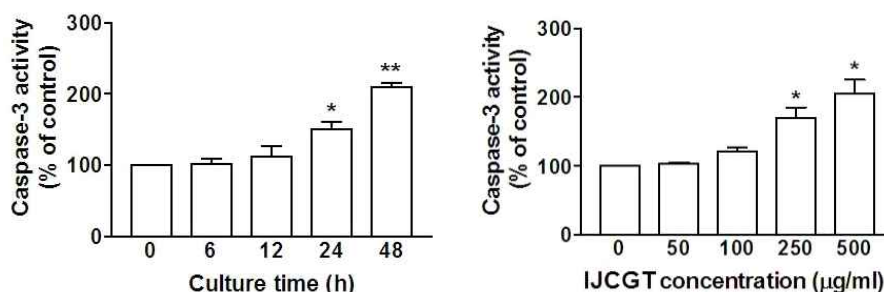


Fig. 4. Effects of IJCGT on the caspase-3 activation in LX2 cells.

Cells were cultured with IJCGT in a dose- and time-dependent manner. The enzymatic activity of caspase proteases was measured by a caspase colorimetric assay. The data represent the mean ± SD of three independent experiments. *p<0.05 and **p<0.01 compared to control.

5. 인진청간탕과 caspase inhibitor의 동시투여가 세포활성에 미치는 영향

IJCGT-treated cells 과 IJCGT and caspase inhibitor-treated cells를 비교했다. 데이터 수치는 control군을 100%로 환산하여 상대적인 수치로 표시

했다. caspase inhibitor 가 증가하면서 세포 생존도가 증가하고 있다. LX2 세포의 apoptosis가 caspase 활성화에 의해 효과가 있다는 것을 나타낸다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effects of IJCGT on the Cell Viability by Caspase Inhibitors in LX2 Cells.

Control	IJCGT	25μm	50μm	100μm	25μm	50μm	100μm
100	55.66±1.45	69.00±3.98*	78.16±2.21**	89.73±0.68**	53.73±0.51	66.43±2.05**	76.13±5.22*

Values represent mean ± standard deviations. * : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test (p<0.05). ** : (p<0.01)

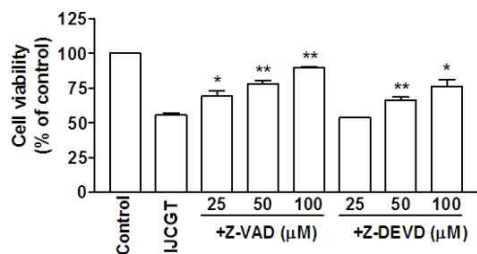


Fig. 5. Effects of IJCGT on the cell viability by caspase inhibitors in LX2 cells.

LX2 cells were treated with IJCGT (500 μg/mL) in the presence or absence of Z-VAD-FMK

(25-100μm) or Z-DEVD-FMK (25-100μm) for 24 h. Cell viability was measured using the MTT assay. Values are the mean ± SD of three independent experiments. *p<0.05 and **p<0.01: IJCGT-treated cells compared to IJCGT and caspase inhibitor-treated cells.

6. 인진청간탕이 mRNA 발현에 미치는 영향

인진청간탕을 처리한 LX2 세포에서는 Bcl-2 mRNA level은 감소했으나, Bax mRNA level은 시간과 농도가 증가함에 따라 증가했다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Effects of IJCGT on the Expression of Pro- and Anti-apoptotic mRNAs in LX2 Cells.

	Bax mRNA				Bcl-2 mRNA			
concentration (μg/ml)	0	100	250	500	0	100	250	500
time (h)	0	12	24	48	0	12	24	48
	1.000	1.017±0.054	1.357±0.033**	1.180±0.067*	1.000	0.918±0.071	0.832±0.026**	0.810±0.003**

Values represent mean ± standard deviations. * : Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test (p<0.05). ** : (p<0.01)

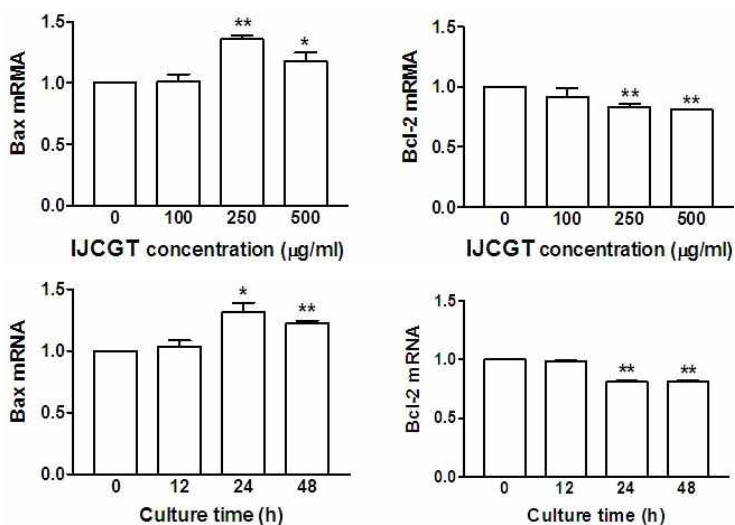


Fig. 6. Effects of IJCGT on the expression of pro- and anti-apoptotic mRNAs in LX2 cells.

LX2 cells were cultured either with different concentrations of IJCGT for 24 h or with 500 μg/mL IJCGT for different amounts of times. mRNA levels were measured by real-time PCR. The crossing point of Bcl-2, Bax with β-actin was applied to the formula, 2-(targetgene-β actin), and relative amounts were quantified. The data represent the mean ± standard deviations of three independent samples. *P<0.05 and **p<0.01 compared to control.

IV. 考 察

간경변증의 대표적인 원인은 알코올의 과다섭취와 B형 및 C형 간염 바이러스에 의한 만성감염이다. 국내 간경변증 환자에서는 63-73% HBsAg 양성으로 B형 간염이 가장 흔한 원인이다¹⁰. 최근에는 시간이 경과함에 따라 HBsAg 양성률은 점차 감소하고 있으나¹¹, 여전히 대한민국은 HBsAg 양성률이 약 5%이하로¹² B형 간염 호발국이다. 다음으로는 20%가 C형 간염에 기인한 간경변증으로 최근 증가하는 추세이다¹⁰. 결국 원인이 무엇이든 선행되는 염증에 의하여 간섬유화가 진행되고, 계속되는 간섬유화의 과정을 거쳐 간경변증을 유발하므로 간섬유화와 관련된 연구의 중요성과 효과적인 치료대책이 더욱 강조되고 있다.

간섬유화는 간조직에서 나타나는 상처치유 과정의 일종이며¹³ 세포외기질 단백질의 과도한 침착을 특징으로 하는 만성간질환의 최종적인 병변이다. 다양한 원인에 의하여 간에 염증이 유발되고 그때 분비된 cytokine이 간성상세포를 증식 및 활성화시키고¹⁴⁻¹⁵, 활성화된 간성상세포는 collagen을 합성하여 세포외 기질내에 축적시켜 간섬유화가 이루어진다¹⁶.

간섬유화는 간경변과 달리 가역적이고 thin fibril로 구성되며, 결절형성이 없는 것으로 알려져있고 간손상의 원인이 소실되면 정상회복이 가능할 수 있으나, 이러한 간섬유화 과정이 반복적으로 지속되면 세포외기질간의 교환결합이 증가하여 thick fibril을 형성하고 결절이 있는 비가역적인 간경변으로 진행된다¹⁷.

간섬유화는 간을 구성하는 4가지 세포 즉 간세포, 혈관상피세포, Kupffer 세포 및 간성상세포가 관여하는데 이중 간성상세포가 간섬유화에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁸. 간성상세포는 1876년 Kupffer에 의해 발견되었으며, Ito에 의해 기술되었으며 1971년 Wake에 의해 정립되었다. 동모양 혈관 내피세포와 간세포사이의 Disse's

space에 위치한 세포로서 별모양이고, 비타민 A를 함유하고 있는 지방 소적을 가지고 있어서 vitamin A storing cell, perisinusoidal hepatic lipocyte 등으로 명명되며, 정상에서는 III, IV형 collagenase과 laminin 등을 생성하고 I형 collagenase는 거의 생성하지 않는데, 손상 받은 간세포나 Kupffer세포 등에서 분비된 여러 가지 cytokine이나 oxidative stress 등에 의해 자극을 받으면 platelet derived growth factor와 TGF- β 의 receptor가 발현하고, 이와 더불어 IV형 collagenase를 분비하여 세포 주변을 둘러싸고 있는 기저막을 손상시킨다¹⁹.

정상적인 간에는 collagen이 문맥엽 주위에 집중되어 있고, 간혈적으로 Disse's space나 중심정맥 부위에 존재하고 있다. 그러나 간섬유화로 인한 간경변증에는 collagen이 간소엽 전체에 광범위하게 분포되어 있어서 혈류의 흐름과 간세포의 물질교환 등을 방해하게 된다. Collagen 과잉분비의 원인으로서는 간 자체가 어느 정도의 collagen을 합성하는 능력이 있기는 하지만, 간성상세포가 독소나 cytokine들 같은 외적인 자극에 의하여 활성화된 후 collagen의 분비를 과도하게 하여 발생하는 것으로 여겨진다²⁰.

이러한 간섬유화 기전을 토대로 간섬유화 치료는 다음의 4가지 방법으로 요약해 볼 수 있다. 첫째는 섬유화를 막기 위한 가장 효과적인 방법으로는 손상 원인을 제거하는 것이고, 둘째는 간의 염증을 억제하는 것이고, 셋째는 간성상세포의 활성화를 억제시키는 것이고, 넷째는 세포외기질의 분해를 촉진시키는 것이다²¹.

한의학에서는 이미 오래전부터 급, 만성 간질환에서 간섬유화, 간경변증, 간암으로의 전변과정을 증후론적으로 잘 관찰하여 왔고^{22,23} 간질환에 투여되는 한약물은 간기능 보호와 개선^{4,24}뿐만 아니라 간경변증의 진행에 있어서 주된 역할을 하는 것으로 인정되는 collagen의 합성을 억제하는 효과에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다^{7,25,26}.

茵陳清肝湯은 清熱利濕하는 茵陳四苓散에 涼血

止血, 下氣行滯 하는 地榆, 靑皮 등을 가미한 처방으로서 실험적 연구에서는 손상된 간 기능의 회복과 동물 간염바이러스를 이용한 전격성간염에서의 생존율을 상승시키는 효과가 있고⁴, DMN으로 유발된 여러 가지 영향의 간손상 병태에 대한 간 보호작용 및 간기능의 회복이 뚜렷하였으며²⁶, TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8 등 inflammatory cytokine 유전자 발현량을 감소시켜 간세포 보호효과가 있음이 보고되었다.⁷

인진청간탕이 간성상세포의 세포 활성과 증식능력 및 세포 사멸에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay, cell cycle analysis, apoptosis assay, caspase-3 protease activity, caspase inhibitor assay 그리고 RT-PCR을 시행하였다.

본 연구에서는 인진청간탕이 간섬유화를 주로 일으키는 간성상세포 LX2 세포의 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 실험시 인진청간탕의 처리 농도는 0, 50, 100, 250, 500 μ g/ml로 결정하였고, 처리 시간은 24시간, 48시간, 72시간으로 하였다. 실험결과 약제의 농도가 높을수록 장시간 처리할수록 간성상세포 활성도 감소가 큰 것으로 나타났다. 간섬유화의 주된 원인인 간성상세포의 활성이 인진청간탕의 농도와 시간에 비례해 감소하여, 간섬유화 억제에 인진청간탕은 효과적인 결과를 나타내었다(Table 2, Fig. 1).

Cell cycle analysis를 통해 인진청간탕은 LX2 세포 안에서 세포순환의 사멸단계를 증가시켰고 세포의 죽음을 증가시켰다는 것을 확인했으며, 이러한 결과들은 인진청간탕이 G1 phase에서 LX2 세포증식을 억제하고 세포주기의 진행을 막을 뿐 아니라 농도의존적으로 세포사멸을 증가시켰다(Fig. 2).

LX2 세포에서의 세포사멸과 함께 인진청간탕에 의한 세포사 유도 연관성을 조사하기 위해 인진청간탕 처리 과정 동안 caspase-3 protease activity를 검토했다. caspase는 세포사멸과정에서 구조정자 역할을 한다. 인진청간탕을 사용한 LX2 세포처리하는 intracellular caspase-3 활동의 증가를 보여준다는

것을 확인했다(Table 3, Fig. 3).

LX2 세포의 apoptosis가 caspase 활성화에 의해 매개되었음을 알기 위해 caspase inhibitor assay를 시행하였다. Caspase는 apoptosis 과정중 중요 매개물이며, caspase 활성도가 증가하게 된다는 것은 LX2 세포의 apoptosis를 증가시켜 간섬유화를 억제한다는 것을 의미한다(Table 4, Fig. 4).

또한 caspase inhibitor assay를 통해 LX2 세포 증식을 확인함으로써 LX2 세포의 apoptosis가 caspase 활성화에 의해 매개되었음을 알 수 있었다. 이 조사결과는 pan-caspase 억제제인 Z-VAD-FMK와 caspase-3-specific 억제제인 Z-VAD-FMK를 사용한 실험들에 의해 확인되었으며, 이는 인진청간탕으로 조절된 세포 증식을 강화시켰다. 따라서 인진청간탕으로 유도된 LX2 세포사멸은 caspase-3 활동에 의해 조절된다는 것을 확인하였다(Table 5, Fig. 5).

RT-PCR을 통해 인진청간탕으로 처리된 LX2 세포 안에서의 pro-apoptotic mRNA와 anti-apoptotic mRNA의 단계들을 검토했고, anti-apoptotic Bcl-2의 발현감소와 pro-apoptotic Bax의 발현증가를 발견했다. 이와 같은 결과들은 감소된 Bcl-2 발현과 증가된 Bax 발현이 인진청간탕의 세포사멸활성을 조절하고 있다는 것을 시사한다(Table 6, Fig. 6).

이상에서 인진청간탕은 세포사멸유도를 통해 LX2 세포의 증식을 막고, 이는 caspase-3를 활성화시켰다. 향후 유효약물 농도와 기전에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

인진청간탕이 간성상세포의 세포 활성과 증식능력 및 세포 사멸에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay, cell cycle analysis, apoptosis assay, caspase-3 protease activity, caspase inhibitor assay 그리고 RT-PCR을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인진청간탕은 간성상세포의 활성도를 농도 및 시간 의존적으로 유의성 있게 억제하였다.
2. 인진청간탕은 간성상세포의 세포주기 분석에서 세포분열과정을 유의성 있게 억제하였다.
3. 인진청간탕은 농도의 증가에 따라 간성상세포의 세포사멸을 유의성 있게 억제하였다.
4. 인진청간탕에서 농도 및 배양시간의 증가에 따라 caspase-3 활성을 유의성 있게 증가하였다.
5. caspase inhibitor의 농도가 증가할수록 인진청간탕에 의한 세포사멸은 유의성있게 감소되었다.
6. 인진청간탕을 처리한 LX2 세포에서는 Bcl-2 mRNA level은 감소되었고, Bax mRNA level은 시간과 농도가 증가함에 따라 증가되었다.

이상에서 인진청간탕은 간성상세포의 활성을 억제시키는 효과가 관찰되었다. 인진청간탕이 간성상세포의 세포사멸을 유도하는 것은 주로 caspase 활성화와 관련이 있는 것으로 판단된다. 향후 약재의 농도와 기전에 대한 심화연구가 필요할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 통계청 사회통계국 인구동향과. 2010년 사망원인 통계결과 [internet]. 통계청:2011. [2011.12.05검색]. Available from: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/1/index.board?bmode=read&bSeq=&aSeq=250282&pageNo=6&rowNum=10&navCount=10&currPg=&sTarget=title&sTxt=
2. 이관식. 간섬유화. 대한소화기학회지 2006;48:297-305.
3. 경희대학교 한의과대학 부속한방병원. 경희한방처방집. 서울: 트윈기획; 1997, p. 244.
4. 우홍정. 만성 B형 간염에 대한 인진청간탕의 효과. 제2회 한중학술대회(간장병)논문집 1995:18-53.
5. 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕의 안전성에 관한 연구. 경희한의대논문집 1997;20(20):133-50.

6. 심재욱, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕이 TGF-β1 매개성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한학회지 2003;24(2):1-11.
7. 김지권, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕이 kupffer cell의 inflammatory cytokine 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(1):46-58.
8. 승현석, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕이 간보호 및 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):21-32.
9. 대한약전외 한약규격집. 서울: 식약청; 1985.
10. 김정룡. 소화기계질환. 서울: 일조각; 2005, p. 662-72.
11. 주광로, 방성조, 송병철. 1990년대 후반 한국 성인의 B형 간염 바이러스 표지자 보유양상, 건강검진 수검자 70,347명의 성적조사. 대한소화기학회지 1999;33:642-52.
12. 권오상, 이창홍. 국내 만성 B형 간염 환자 자녀들의 HBV 감염율의 변화. 대한간학회지 2001;7(3s):160-2.
13. Bissel DM, Maheer JJ. Hepatic fibrosis and cirrhosis. A textbook of liver disease. Philadelphia: WB Saunders; 1998, p. 506-25.
14. Gressner AM. Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops and extracellular matrix molecules. *J Gastroenterol* 1992;30(s):5-16.
15. Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(7):618-33.
16. Niemela O. Collagen breakdown products as markers of fibrosis and cirrhosis. *Alcohol Acohol Supple* 1994;2:345-52.
17. 이관식. 간섬유화 기전. 대한간학회 제3차 Postgraduate Course 2005:9-19.
18. Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol*

- 1997;32(3):424-30.
19. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanism and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-35.
 20. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 834-5.
 21. 권영오. 간섬유화 치료의 최신지견. 대한간학회 제3차 Postgraduate Course 2005:33-9.
 22. 장중경. 금궤요략. 서울: 행림서원; 1984. p. 32-4.
 23. 전국 간계내과학 교수 일동. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001. p. 323-50.
 24. 이장훈. 三七生肝湯의 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집 1994;17(2):17-39.
 25. 이지현, 이장훈, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):93-106.
 26. 박상백, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳淸肝湯이 DMN 유발 간섬유화 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(1):200-18.