

## 간성상세포에서 桑葉 추출물의 섬유화 억제 효과

변성희<sup>1#</sup>, 박상미<sup>1,2</sup>, 김상찬<sup>1,2</sup>, 조일제<sup>1,2\*</sup>

1 : 대구광역시 수성구 신천동로 대구한의대학교 한의과대학,

2 : 경상북도 경산시 한의대로 1, 대구한의대학교 한의과대학 방제과학글로벌 연구센터

### Anti-fibrotic Effect of Mori Folium Extract in Hepatic Stellate Cells

Sung Hui Byun<sup>1#</sup>, Sang Mi Park<sup>1,2</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2</sup>, Il Je Cho<sup>1,2\*</sup>

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-060,

2 : MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongsangbukdo 712-715, KOREA

#### ABSTRACT

**Objectives** : Mori Folium was popularly used as one of the traditional medicinal herbs. Although M. Folium has been cultivated for rearing silkworm historically, it's use has been expanded as natural therapeutic agent for the treatment of filariasis, diabetes and dropsy in East Asia. However, little has been known about the effect of M. Folium on liver fibrosis. Therefore, we would like to explore an anti-fibrogenic potential of M. Folium extract (MFE) using immortalized human hepatic stellate cell line, LX-2 cells.

**Methods** : We examined the effects of MFE on the transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$  1)-induced liver fibrosis in LX-2 cells. Cell viability, Smad binding element-driven luciferase activity, phosphorylations level of Smad 2/3, and expression level of TGF $\beta$  1-dependent target genes were monitored in the MFE-treated LX-2 cells.

**Results** : Up to 30  $\mu$ g/ml MFE treatment did not show any possible toxic effect in LX-2 cells. MFE inhibited TGF $\beta$  1-inducible Smad binding element-driven luciferase activity and decreased the TGF $\beta$  1-inducible phosphorylations of Smad 2 and Smad 3 in hepatic stellate cell in a dose dependent manner. Furthermore, increases of plasminogen activator inhibitor type 1, TGF $\beta$  1 and matrix metalloproteinases 2 genes by TGF $\beta$  1 were also attenuated by MFE treatment.

**Conclusions** : These findings suggested that MFE would be used as a potential therapeutic agent for the treatment liver fibrosis, which might be mediated by the inhibition of TGF $\beta$  1-inducible Smad 2/3 transactivation and target genes expression.

**Key words** : Mori Folium; LX-2 cells; Liver fibrosis ; TGF $\beta$  1; Smad

#### 서론

간은 체외에서 들어온 물질 및 체내의 물질대사에서 중추적인 역할을 담당하는 생체기관이며, 한국 내의 만성 질병 중에서 간염, 간섬유화 및 간암이 차지하는 비중은 순환기계 질환과 함께 큰 비중을 차지하고 있다. 특히 우리나라의 경우, 선진국에 비하여 음주인구가 상대적으로 높고 폭음에 의한 간

손상 발생이 높은 만큼 간질환에 대한 관심도 지대하다. 따라서 간조직의 생리적 특성 및 중요성을 고려할 때 간질환의 치료 및 예방은 대단히 중요하며 간 조직손상을 줄이고 간기능을 정상화시킬 수 있는 약물 타겟 발굴이 요구되는 실정이다.

간섬유화는 만성적인 염증으로 인해 정상적인 간조직이 광범위하게 파괴된 결과로 섬유조직의 증식과 재생성 결절 형성의 형태학적 특징을 보이며, 2차적으로 간 내 혈관의 변형 및

\*교신저자 : 조일제, 712-715, 경상북도 경산시 한의대로 1, 대구한의대학교 한의과대학 방제과학글로벌 연구센터

· Tel : 053-819-1862 · Fax:053-819-1860 · E-mail : skek023@dhu.ac.kr

#제1저자 : 변성희, 706-060, 대구광역시 수성구 신천동로 136, 대구한의대학교 한의과대학

· Tel : 053-770-2244 · Fax: 053-768-6340 · E-mail : shbyun@dhu.ac.kr

· 접수 : 2013년 6월 19일 · 수정 : 2013년 7월 3일 · 채택 : 2013년 7월 18일

간기능의 저하가 초래되는 비가역적 질병이며<sup>1)</sup>, 간 섬유화로 의 진행과정에 있어 간성상세포 (hepatic stellate cell)가 핵심적 역할을 수행하는 세포로 보고되고 있다<sup>2)</sup>. 반복적 간손상으로 인한 염증과 회복과정의 반복은 휴지기 (quiescent) 간성상세포를 활성화하여 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)과 다양한 사이토카인 (cytokine) 및 케모카인 (chemokine) 들을 분비하며, 이 중 형질전환성장인자 베타1 (transforming growth factor  $\beta$  1, TGF $\beta$  1)의 분비는 plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) 및 matrix metalloproteinases (MMP)의 발현 조절을 통하여 ECM (예, collagen) 축적을 촉진하는 핵심 사이토카인이다<sup>3)</sup>.

TGF $\beta$  1은 세포막 수용체를 통하여 다양한 세포 내 신호 네트워크를 활성화시키며, TGF $\beta$  1에 의해 활성화되는 대표적인 신호분자는 Smad이다<sup>4)</sup>. TGF $\beta$  1 자극은 세포질에 존재하는 Smad 2 및 Smad 3의 인산화와 더불어 Smad 4와의 결합을 촉진한다. TGF $\beta$  1에 의해 형성된 Smad 2/4 또는 Smad 3/4 복합체는 핵으로 이동하여, PAI-1, MMP 및 collagen 등을 포함한 표적유전자 프로모터의 CAGA box (또는 Smad binding element, SBE)에 결합하여 이들 유전자의 발현을 증가시킨다<sup>5-8)</sup>. 따라서 간 섬유화의 진행과정에서의 TGF $\beta$  1 및 이를 매개로 형성되는 세포 내 신호 네트워크의 조절은 간 섬유화의 진행 억제 및 치료에 있어 중요한 약물표적으로 작용할 수 있으며, 천연의 소재로부터 TGF $\beta$  1을 매개한 간성상세포의 활성을 조절할 수 있는 후보소재를 발굴하려는 시도 또한 활발하게 진행되고 있다.

桑葉 (Mori Folium)은 疏散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目하는 효능이 있으며 頭痛, 目赤, 口渴, 肺熱로 인한 咳嗽, 風痺, 蕁麻疹을 치료한다<sup>9)</sup>. 상엽에는 flavones, steroids, triterpenes, 아미노산, 비타민 및 다량의 미네랄 성분이 존재하고 있으며 칼슘, 칼륨 등의 전해질과 펩틴, 셀룰로오스 등의 식이섬유나 아미노산, 단백질 등이 풍부하다. 상엽은 혈당 강하, 혈압 강하, 이뇨, 및 항균 효능이 있음이 규명되었으며, filaria에 의한 림프관염에 치료 효과가 있고, 하지의 象皮腫 연화, 부종 제거 작용이 있음이 증명되었다. 최근에는 상엽의 LPS에 의해 활성화된 대식세포의 염증매개인자 억제, 지방 사이토카인 (adipokine) 억제, 항동맥경화 (anti-atherogenic) 효과 및 항우울 (anti-depressant) 효과 등이 보고되고 있으나<sup>10-14)</sup>, 상엽의 만성 간질환에 대한 효능 평가 및 분자 기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 상엽 에탄올 추출물 (M. Folium extract, MFE)의 간섬유화 예방 및 치료의 효능을 평가하기 위하여 질환 진행과정의 핵심적 역할을 담당하는 간성상세포에서 MFE를 전처리한 후, TGF $\beta$  1으로 유도된 표적유전자들의 발현을 관찰하였고, 그 분자 기전으로서 Smad 분자의 인산화 및 활성화 과정에 미치는 영향을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 GibcoBRL

(Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. L-glutamine은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였고, TGF $\beta$  1은 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), lupeol, morin, myo-inositol, quercetin, rutin, scopoletin, umbelliferone은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Phosphorylated Smad 2 (p-Smad 2), phosphorylated Smad 3 (p-Smad 3) 및 Smad 2/3 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), actin과 PAI-1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

### 2. 추출물의 제조

MFE는 상엽 300 g에 3 L의 100% 에탄올을 가하고 상온에서 72시간 동안 추출하여 No.2 filter paper (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과한 후 여액을 진공회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축액을 Ultra-low temperature freezer (Operon, Korea)에 12시간 동안 동결하여 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)로 동결건조하고 사용할 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. MFE의 최종 수율은 2.598%이며 실험 시 DMSO에 용해하여 사용하였다.

### 3. 세포 배양

사람의 불멸화 간성상세포주인 LX-2 세포는 Dr. Friedman S.L. (Mount Sinai School of Medicine, USA)로부터 제공받아 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin 및 1% L-glutamine이 함유된 DMEM 배지를 이용하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. LX-2 세포를  $5 \times 10^4/\text{ml}$  농도로 24 well plate에 각각 분주하고 serum free 배지로 교환한 후 6시간 동안 배양하였다. MFE 3-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.

### 4. 세포독성 측정

약물 처리된 세포를 24시간 배양한 후, 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 넣고 4시간 추가 배양하였다. 배양액을 제거하고 DMSO를 가하여 생성된 formazan을 용해시킨 후 Titertek Multiskan Automatic microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control 세포에 대한 백분율로 나타내었다 [Viability (% of control) = (absorbance of treated sample)/(absorbance of control) x 100].

### 5. 리포터 유전자 분석

Human PAI-1 프로모터를 함유한 reporter plasmid (pGL-phPAI-798), Smad 3 과발현 plasmid (pCDNA-Flag-Smad3), Smad binding element를 함유한 reporter plasmid (pGL3-(CAGA)<sub>9</sub>-MLP-luciferase),

transfection efficiency를 보정하기 위한 pRL-SV는 기존 문헌 보고에 따라 본 연구실에서 기 확보하였다<sup>8)</sup>. 12 well plate에 배양한 LX-2 세포에 Fugene HD (Promega Co., Madison, WI, USA)을 이용하여 500 ng plasmid를 3 시간 동안 transfection 시키고 약 3시간 동안 FBS가 없는 DMEM 배지 하에서 안정화시켰다. 세포에 MFE (10, 30 µg/ml)를 30분 동안 전처리하고 5 ng/ml TGFβ 1을 18시간 동안 처리한 후 passive lysis buffer (Promega)를 이용하여 용해하고 dual luciferase reporter assay system (Promega)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 리포터 유전자 활성을 측정하였다. 상대적인 luciferase 활성은 각 세포에서 발현하는 firefly luciferase 활성을 *Renilla* luciferase로 보정하여 표현하였다.

## 6. Immunoblot 분석

전세포 추출액 (whole cell lysates)은 본 연구실에서 기 확립된 방법에 따라 제조하였다<sup>10)</sup>. 정량한 단백질 50 µg을 취하여 10% SDS-PAGE에 전기영동시킨 후 NC membrane으로 단백질을 전이시켰다. Smad 2/3, p-Smad 2, p-Smad 3, PAI-1 및 actin 1차 항체와 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시키고 ECL detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis는 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

## 7. RNA 분리 및 realtime PCR 분석

처리된 세포로부터 total RNA의 분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA (2 µg)와 d(T)<sub>16</sub> primer 및 AMV 역전사 효소 (reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 얻었다. PAI-1, TGFβ 1 및 MMP-2 유전자는 각 유전자 특이적 primer (Table 1)와 SYBR Primix Ex Taq (Takara)을 사용한 realtime PCR (Realtime PCR System 7500, Applied biosystems, Foster, CA)에 의해 정량하였다. 유전자의 상대정량은 각 유전자의 C<sub>T</sub> 값을 GAPDH 유전자의 C<sub>T</sub> 값으로 gene express 2.0 프로그램 (Applied biosystems)을 이용하여 보정하였다. 또한 melting curve 분석을 통하여 증폭된 PCR 산물의 특이성을 확인하였다.

Table 1. Primer Sequences Used in This Study

Gene	Sense primers	Anti-sense primers
PAI-1	5'-GACACCCTCAGCATGTTTCATC-3'	5'-AGGGTTGCACTAAACATGTTCAG-3'
TGFβ 1	5'-GGCAGTGGTTGAGCCGTGGA-3'	5'-TGTTGGACAGCTGCTCCACCT-3'
MMP-2	5'-GTATTGATGGCATCGCTCA-3'	5'-CATTCCCTGCAAGAACACA-3'

## 9. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D로 나타내었으며 student t-test 방법으로 통계적 유의성 검증을 조사하였다. 유의수준은  $p < 0.05$  미만인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 1. MFE의 세포생존율

간성상세포주인 LX-2 세포에서 MFE의 세포독성을 평가하기 위하여, 3-100 µg/ml MFE를 24시간 처리한 후 MTT assay를 통하여 세포생존율을 측정하였다 (Figure 1). LX-2 세포에 24시간 동안의 3-30 µg/ml MFE 처리는 대조군 세포에 비하여 세포 생존율의 변화를 관찰할 수 없었고, 100 µg/ml MFE는 대조군 세포 대비  $74.3 \pm 1.77\%$ 로 세포 독성을 확인할 수 있었다. 따라서 이후 실험에서는 세포독성이 관찰되지 않는 30 µg/ml 농도 이하의 MFE를 이용하여 LX-2 세포에서 TGFβ 1 하위 신호전달망에 미치는 영향과 TGFβ 1에 의해 유도되는 표적유전자의 발현을 평가하였다.

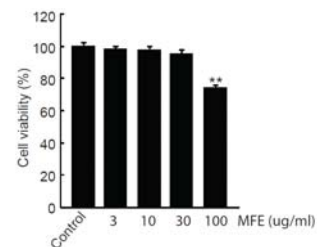


Figure 1. Effect of MFE on LX-2 cell's viability. LX-2 cells were incubated in 3-100 µg/ml of MFE for 24 h. Relative cell viability was measured by MTT assay. Data represent mean ± S.D. of three independent experiments (Significant as compared to control, \*\* $p < 0.01$ ; cell viability of untreated LX-2 cells = 100%). Mori Folium extract, MFE.

### 2. MFE가 TGFβ 1에 의해 유도되는 Smad 분자의 활성화에 미치는 영향

TGFβ 1은 세포 표면의 수용체에 결합하여 Smad 전사인자를 포함한 다양한 신호분자를 활성화시키고, 이를 통하여 ECM을 축적한다<sup>9)</sup>. 따라서 MFE가 반복적 간손상 조직에서 증가하는 TGFβ 1에 의한 Smad 분자의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, Smad 분자의 DNA 결합에 의한 표적 유전자 발현을 지표할 수 있는 Smad 결합영역 (SBE)을 포함한 리포터 유전자를 LX-2 세포에 도입한 후, TGFβ 1 및 MFE에 의한 상대적 luciferase 활성을 측정하였다. LX-2 세포에 50 ng/ml TGFβ 1의 처리는 luciferase 활성을  $96.16 \pm 4.9$ 배 증가시켰고, 10 및 30 µg/ml MFE 처리에 의하여 각각  $45.87 \pm 2.83$  및  $36.54 \pm 7.33$ 배 농도 의존적으로 감소하였다 (Figure 2A). Smad 전사인자의 표적유전자 프로모터 영역의 결합 및 이에 의한 표적 유전자의 발현 조절을 위해서는 반드시 Smad 분자의 인산화가 수반되며, TGFβ 1 자극에 의해서는 세포 내에서 Smad 3와 Smad 2 분자가 주로 인산화되는 것으로 보고되었다<sup>15)</sup>. 따라서 TGFβ 1에 의해 활성화된 간성상세포에서 MFE가 Smad 분자의 활성화 억제에 Smad 분자의 인산화 조절이 관여하는지 평가하기 위하여 TGFβ 1와 MFE를 처리하고 Smad 3와 Smad 2의 인산화를 immunoblot 분석을 통하여 관찰하였다 (Figure 2B). LX-2 세포에 1시간 동안 처리한 5 ng/ml TGFβ 1은 Smad 3와 Smad 2의 인산화를 증가시켰고, 10 및 30 µg/ml MFE 전처

치는 TGF $\beta$  1에 의해 증가하는 Smad 3와 Smad 2의 인산화를 통계적으로 유의한 수준으로 각각 억제하였다.

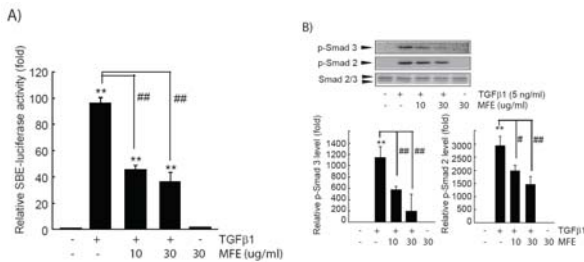


Figure 2. Effect of MFE on the TGF $\beta$  1-mediated Smad activation. A) Smad reporter assay. LX-2 cells that had been transiently transfected with pGL3-(CAGA)<sub>3</sub>-MLP-luciferase construct were treated with MFE (10, 30  $\mu$ g/ml) for 0.5 h with subsequent exposure to TGF $\beta$  1 (5 ng/ml) for 18 h. The relative luciferase activity was calculated by normalizing SBE-driven firefly luciferase activity to that of *renilla* luciferase. B) Effect of MFE on Smad phosphorylation. Smad phosphorylations were examined on the cell lysates treated with MFE (10, 30  $\mu$ g/ml) for 0.5 h with subsequent exposure to TGF $\beta$  1 (5 ng/ml) for 1 h. The relative levels of protein bands were measured by scanning densitometry. All values represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (Significant as compared to control, \*\* $p$  < 0.01; significant as compared to TGF $\beta$  1 alone, ## $p$  < 0.01, # $p$  < 0.05). Smad binding element, SBE.

다음으로 MFE가 TGF $\beta$  1에 의한 Smad 분자의 활성화를 직접적으로 억제할 수 있는지 여부를 평가하기 위하여 TGF $\beta$  1 자극 대신 LX-2 세포에 Smad 3를 직접적으로 과발현시켜 Smad 신호를 활성화시켰다. Figure 3에서 제시하는 바와 같이 LX-2 세포에서 Smad 3의 과발현은 SBE를 포함한 리포터 유전자 활성을 증가시켰고, 30  $\mu$ g/ml MFE의 처리는 Smad 3 과발현에 의한 리포터 유전자 활성을 억제하였다. 이러한 결과는 MFE가 LX-2 세포에서 TGF $\beta$  1에 의해 유도되는 신호를 전달하는 Smad의 인산화를 저해하여 Smad의 의존적 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있음을 시사한다.

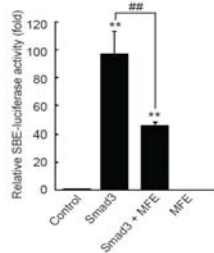


Figure 3. Effect of MFE on the Smad 3-induced Smad transactivation.

LX-2 cells were co-transfected pGL3-(CAGA)<sub>3</sub>-MLP-luciferase with pCDNA-Flag-Smad3, and then treated with 30  $\mu$ g/ml MFE for 18 h. Control cells were cotransfected pGL3-(CAGA)<sub>3</sub>-MLP-luciferase with empty plasmid (pCDNA3.1). The relative luciferase activity was calculated as described in Fig. 2A). Data represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (Significant as compared to control, \*\* $p$  < 0.01, significant as compared to Smad 3-transfected cells, ## $p$  < 0.01).

### 3. MFE가 TGF $\beta$ 1 의존적 표적 유전자 발현에 미치는 영향

MFE에 의한 Smad 분자의 활성 억제에 TGF $\beta$  1 의존적

표적 유전자의 발현을 직접적으로 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 프로모터 내 SBE를 가지고 있는 대표적인 표적 유전자인 PAI-1의 프로모터 활성, mRNA 발현 및 단백질 발현을 관찰하였다<sup>6,7</sup>. LX-2 세포에서 5 ng/ml TGF $\beta$  1의 처리는 PAI-1 프로모터의 활성, mRNA 및 단백질 발현을 통계적으로 유의한 수준으로 증가시켰다 (Figure 4 A-C). Smad 활성을 효과적으로 억제할 수 있었던 30  $\mu$ g/ml의 MFE는 TGF $\beta$  1 유도성 PAI-1 증가를 모두 감소시켰다 (Figure 4 A-C). TGF $\beta$  1은 간성상세포에서 PAI-1의 발현 증가와 더불어 TGF $\beta$  1을 포함한 다양한 ECM 재배열 관련 유전자의 발현을 증가시킨다<sup>8</sup>. 간성상세포에서 MFE의 ECM 재배열 관련 유전자의 발현 조절을 확인하기 위하여 TGF $\beta$  1에 의해 유도되는 TGF $\beta$  1 및 MMP-2 mRNA의 발현을 realtime PCR 분석에 의해 관찰하였다. 5 ng/ml TGF $\beta$  1의 처리는 TGF $\beta$  1 및 MMP-2 mRNA를 각각  $5.64 \pm 0.62$  및  $10.24 \pm 0.89$ 배 증가시켰으며, 30  $\mu$ g/ml의 MFE는 TGF $\beta$  1 의존적 TGF $\beta$  1 및 MMP-2 mRNA를 각각  $3.55 \pm 0.60$  및  $5.94 \pm 0.63$ 배로 통계적으로 유의한 수준으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다 (Figure 4D). 이상의 결과는 MFE가 TGF $\beta$  1 의존적 표적 유전자의 발현 억제를 통하여 성상세포의 활성화를 통한 간섬유화를 억제할 수 있음을 시사한다.

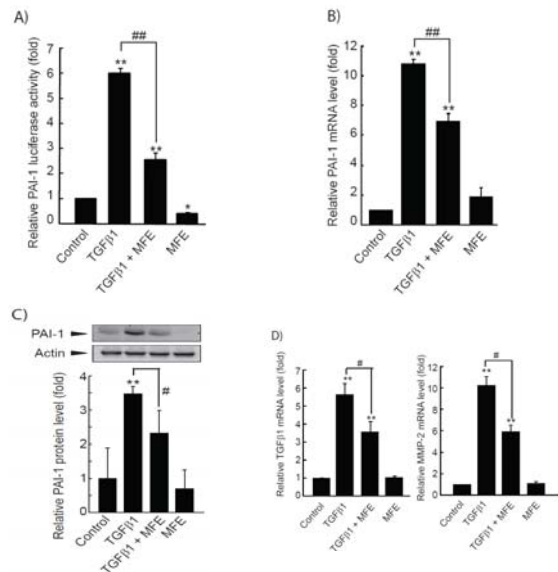


Figure 4. Effect of MFE on the TGF $\beta$  1-mediated target genes induction.

A) PAI-1 promoter-driven reporter gene assay. LX-2 cells were transfected with pGL-hPAI1-798. Transiently transfected cells were exposed 30  $\mu$ g/ml MFE for 0.5 h, and then subsequently treated with TGF $\beta$  1 (5 ng/ml) for 18 h. B) Realtime PCR. Relative PAI-1 mRNA levels were measured from cells that had been treated with TGF $\beta$  1 (5 ng/ml) for 6 h in the presence or absence of 30  $\mu$ g/ml MFE. C) PAI-1 immunoblotting. PAI-1 protein expressions were examined on the cell lysates treated with MFE (30  $\mu$ g/ml) for 0.5 h with subsequent exposure to TGF $\beta$  1 (5 ng/ml) for 18 h. Equal amounts of total protein (50  $\mu$ g/lane) were separated by SDS-PAGE. The actin was used as a loading control (Upper). The relative levels of protein bands were measured by scanning densitometry (Lower). D) TGF $\beta$  1 and MMP-2 expression. Relative TGF $\beta$  1 and MMP-2 mRNA levels were monitored by realtime PCR as described in B). All values represent mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (Significant as compared to control, \*\* $p$  < 0.01; significant as compared to TGF $\beta$  1 alone, ## $p$  < 0.01, # $p$  < 0.05).



#### 4. 상엽의 주요 활성 성분들이 TGFβ 1 의존적 PAI-1 발현에 미치는 영향

상엽 에탄올 추출물의 간성상세포의 활성제어 효능에 있어 상엽 내 존재하는 주요 활성 성분의 효과를 평가하기 위하여 lupeol, morin, myo-inositol, quercetin, rutin, scopoletin, umbelliferone이 TGFβ 1에 의하여 유도된 PAI-1의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 세포 독성을 나타내지 않는 최고 농도 (100 μM)에서 상엽에 포함된 것으로 보고된 주요 활성 성분은 모두 TGFβ 1으로 증가된 PAI-1의 단백질 발현을 억제하였다 (Figure 5).

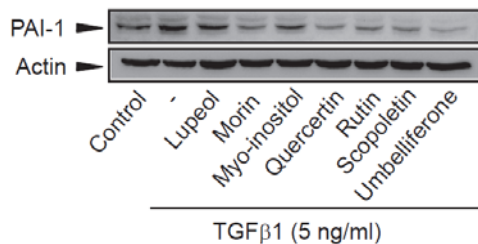


Figure 5. Effect of active compounds in MFE on the TGFβ 1-mediated PAI-1 expression. LX-2 cells were pretreated with active compounds in MFE (100 μM each) for 0.5 h and further incubated with TGFβ 1 (5 ng/ml) for 18 h. PAI-1 immunoblotting were performed as described in Figure 4C). Results were confirmed by repeated experiments.

## 고찰

간섬유화 및 간경화는 만성적이고 반복적인 간손상의 결과로써 섬유조직의 증식 및 재생성 결절을 나타내는 질환이다. 간섬유화 과정에서 간조직 내에 증가한 TGFβ 1은 휴지기 (quiescent) 간성상세포를 근섬유모세포 (fibroblast) 성격의 세포로 활성화시키고 비정상적인 ECM의 축적에 관여하는 핵심 사이토카인이다. 활성화된 간성상세포에서 collagen을 포함한 ECM의 축적에 있어 TGFβ 1의 자극에 의한 Smad 3 단백질의 지속적인 활성화가 핵심역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다<sup>4,15,16</sup>). TGFβ 1은 세포막 표면에 존재하는 두 개의 TGFβ 1 수용체 중 먼저 TGFβ RII 수용체와 결합하여 TGFβ RI과의 복합체 형성을 유도한다. TGFβ 1과 수용체의 결합은 TGFβ RI의 자발적 인산화를 유도하고, 이를 통하여 세포내 Smad 2와 Smad 3 단백질의 인산화 및 Smad 4와의 결합을 통한 복합체를 형성하여 핵 내로 이동하며, 핵 내로 전위된 Smad 2/4 또는 Smad 3/4 복합체는 표적 유전자 프로모터의 SBE 영역에 결합한다<sup>17</sup>). 따라서 TGFβ 1은 세포 내에서 Smad 분자의 활성화를 통하여 ECM 축적, 정상세포 재활성화에 관련된 TGFβ 1, PAI-1, 및 MMP-2 등의 일련의 유전자군의 발현을 조절한다. TGFβ 1에 의해 유도되는 PAI-1의 생성은 간섬유화 진행 과정 중에 촉진되어 MMP 활성화와 plasmin 생성을 억제하여 조직 재배열에 관여한다. PAI-1은 활성화되지 않은 간성상세포에서는 발현되지 않으며, 활성화된 간성상세포에서 간섬유화가 진행되는 동안 정상 MMP의 억제로 인하여 PAI-1의 발현은 증가한다<sup>7,18</sup>).

桑葉은 疏散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目하는 효능이 있어, 風

溫發熱, 頭痛, 目赤腫痛, 口渴, 肺熱燥咳, 風癩, 隱疹을 치료하는데 최근에는 항염증, 혈당강하, 혈압강하, 이뇨, 항균, 항부종, 항필라리아병, 항동맥경화, 항우울 등의 효과가 보고되고 있다<sup>9-14</sup>). 본 연구는 상엽 에탄올 추출물 (MFE)이 TGFβ 1의 작용 저해 및 섬유화 신호 전달 과정 차단을 통하여 간섬유화 과정 및 간성상세포의 활성을 제어할 수 있는지 살펴 보았다. MFE의 LX-2 세포에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였고, 실험 결과 MFE 3, 10, 30 μg/ml의 농도에서는 거의 세포독성을 나타내지 않았으며, 100 μg/ml의 농도에서는 대조군 세포와 비교하여 약 25.7% 내외의 세포 독성을 나타내었다. 따라서 세포독성이 관찰된 MFE 100 μg/ml의 농도를 제외하고 실험을 진행하였다.

TGFβ 리간드류에 의해 활성화되어 세포 신호를 전달하는 Smad 단백질은 9종의 단백질이 보고되고 있으며 크게 R-Smad (Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5, Smad 8/9), co-Smad (Smad 4), I-Smad (Smad 6, Smad 7)의 3가지로 분류할 수 있다<sup>17</sup>). 이 중 간성상세포에서 TGFβ 1에 의한 세포 내 신호전달 과정에는 주로 Smad 3와 Smad 2가 R-Smad로서 인산화되며, Smad 4와 복합체를 형성하여 핵 내로 이동한다. 따라서 Smad 신호 네트워크의 조절은 간성상세포의 활성화와 제어를 통한 간섬유화 질환을 치료할 수 있는 대표적인 약물작용점으로 간주되고 있다. 일례로, 간섬유화에 효능을 나타내는 디치올치온계 약물이 간성상세포에서 C/EBPβ의 활성화와 더불어 Smad 3의 선택적 인산화를 억제할 수 있음이 보고되었다<sup>9,19</sup>). 이와 더불어 간성상세포에서 Smad 7의 인위적인 과발현은 간성상세포의 활성화를 억제하고 간섬유화를 억제할 있으며<sup>20</sup>, 간성상세포에서 E-cadherine의 발현은 Rho 의존적 Smad 3의 인산화를 억제할 수 있음이 보고되었다<sup>8</sup>).

본 연구에서는 Smad 신호를 억제할 수 있는 한의약물학적 소재의 발굴을 위한 연구로서 상엽 에탄올 추출물을 발굴하였다. 본 연구에서는 TGFβ 1에 의하여 활성화되는 대표적 전사인자인 Smad 분자의 활성화에 미치는 MFE의 영향을 평가하기 위하여 Smad 결합영역인 SBE를 포함한 리포터 유전자의 발현을 조사하였다. 실험 결과 TGFβ 1으로 유도된 SBE의 유전자 활성이 MFE 10, 30 μg/ml에 의하여 농도 의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었고, TGFβ 1에 의해 증가한 Smad 2와 Smad 3의 인산화 또한 10, 30 μg/ml MFE에 의하여 통계적으로 유의한 수준으로 감소하였음을 immunoblot 분석을 통하여 확인하였다. 활성화된 간성상세포에서는 Smad 2에 비해 Smad 3의 지속적 인산화가 관찰되며<sup>21</sup>), 간섬유화 과정에서 Smad 3의 활성을 직접적으로 억제할 수 있는지 관찰하기 위하여 Smad 3 단백질을 과발현하였다. Figure 3에서 제시하는 바와 같이 LX-2 세포에서 MFE는 Smad 3 과발현에 의한 리포터 유전자 활성을 직접적으로 억제하였다. 이상의 결과는 MFE가 LX-2 세포에서 TGFβ 1에 의해 유도되는 신호를 핵 안으로 전달하는 Smad의 인산화를 저해하여 Smad 의존적 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있음을 시사한다.

TGFβ 1 자극에 의해 핵으로 이동된 Smad 복합체는 표적 유전자 프로모터의 'CAGA box'라 불리는 SBE에 결합하여 PAI-1을 포함한 ECM 축적에 관여하는 표적 유전자군의 발

현을 조절한다<sup>5-8)</sup>. MFE에 의한 Smad 신호의 제어가 궁극적으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는지 여부를 평가한 결과 MFE는 TGF $\beta$  1에 의해 증가되는 PAI-1 mRNA, 단백질 및 프로모터 활성을 모두 억제하였다 (Figure 4 A-C). 이와 더불어 TGF $\beta$  1 자극에 의해 간성상세포의 활성화 및 ECM 축적을 위한 재배열에 관여하는 TGF $\beta$  1 의존적 TGF $\beta$  1과 MMP-2 mRNA 또한 MFE의 처치에 의하여 억제될 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 MFE가 TGF $\beta$  1 의존적 표적유전자의 발현 억제를 통하여 간성상세포의 활성을 제어할 수 있음을 시사한다.

상엽에는 lupeol, morin, myo-inositol, quercetin, rutin, scopoletin, umbelliferone 등의 활성성분이 함유되어 있는 것으로 보고되었다<sup>22)</sup>. 이중 quercetin은 대표적인 polyphenol flavonoid 화합물로서 항산화능의 유도, 염증성 싸이토카인의 억제를 통한 다양한 간섬유화 동물모델에서 ECM 축적과 성상세포의 활성화를 억제할 수 있음이 보고되었다<sup>23-25)</sup>. Morin 또한 dimethylnitrosamine으로 유도된 간섬유화 동물모델에서 성상세포의 활성을 억제할 수 있는 효능이 보고되었다<sup>26)</sup>. 비록 상엽에 존재하는 일부 활성성분이 간섬유화 모델에서 유효성이 확보되었으나, 이들 주요 활성성분이 간성상세포에서 직접적으로 ECM 축적 관련 유전자에 미치는 영향 및 이를 추론할 분자기전에 대한 연구는 상대적으로 부족하였다. 따라서 MFE의 항섬유화 효능에 상엽 내 존재하는 주요 활성성분의 효능에 기인한 것인지 확인하기 위하여 TGF $\beta$  1 의존적 PAI-1 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 비록 MFE 내에 존재하는 주요 활성성분의 농도 및 MFE 처치 시 세포 내 존재하는 주요 활성성분 농도와 본 연구에서 활용한 주요 활성성분의 농도 사이의 상호 관련성에 있어 후속연구가 필요하나, 상엽 내 주요 활성성분인 lupeol, morin, myo-inositol, quercetin, rutin, scopoletin, umbelliferone 등은 TGF $\beta$  1으로 증가된 PAI-1의 단백질 발현을 감소시켰다. 따라서 MFE의 항섬유화 효능은 상엽 내 존재하는 여러 활성 성분들의 복합적인 약리작용에 기인한 것으로 추측된다. 따라서 상엽의 항섬유화 기전 및 효능을 이해한 본 연구와 더불어 적절한 후속 연구가 이루어진다면, 상엽을 간섬유화 및 간경화를 효과적으로 억제할 수 있는 신규 한의약물로 개발할 수 있는 학문적 배경을 제시할 수 있을 것으로 기대한다.

## 결론

본 연구에서는 상엽 에탄올 추출물 (MFE)이 간성상세포주에서 TGF $\beta$  1 의존성 Smad 신호 전달 및 표적유전자 발현 조절을 통하여 간섬유화 및 간경화에 대한 억제 효과를 나타낼 수 있는지 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 상엽 에탄올 추출물은 간성상세포에서 TGF $\beta$  1에 의해 증가하는 SBE 리포터 유전자 활성 및 Smad 3 및 Smad 2의 인산화를 농도 의존적으로 억제하였다.
2. 상엽 에탄올 추출물은 Smad 3 유도성 SBE 리포터 유전자 활성을 억제하였다.

3. 상엽 에탄올 추출물은 TGF $\beta$  1 의존적 PAI-1의 리포터 유전자 활성, mRNA 발현 및 단백질 발현을 억제하였으며, TGF $\beta$  1 의존적 TGF $\beta$  1과 MMP-2 mRNA를 감소시켰다.

4. 상엽에 보고된 주요 활성성분들은 TGF $\beta$  1에 의해 증가된 PAI-1 단백질 발현을 억제하였다.

이러한 상엽 에탄올 추출물의 항섬유화 효능은 간섬유화 질환을 효과적으로 제어할 수 있는 약물 개발 가능성을 제시한다.

## 감사의 글

본 연구는 2012년도 한국연구재단 (No.2012-0009400) 및 대구한의대학교 기린연구비 (2012-901-37)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## Reference

1. Bataller B, Brenner DA. Hepatic Fibrosis. In : Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Fausto N, Shafritz DA, Wolkoff AW, eds. The liver biology and pathobiology. 5th ed. Oxford : Wiley-Blackwell, 2009 : 433-52.
2. Lee JS, Kim JH. The role of activated hepatic stellate cells in liver fibrosis, portal hypertension and cancer angiogenesis. Korean J Hepatol. 2007 ; 13 : 309-19.
3. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor b1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. Proc Natl Acad Sci USA, 1995 ; 92 : 2572-6.
4. Liu C, Gaca MD, Swenson E, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF- $\beta$  independent. J Biol Chem. 2003 ; 278 : 11721-8.
5. Jablonska E, Markart P, Zakrzewicz D, Preissner KT, Wygrecka M. Transforming growth factor- $\beta$  1 induces expression of human coagulation factor XII via Smad3 and JNK signaling pathways in human lung fibroblasts. J Biol Chem. 2010 ; 285 : 11638-51.
6. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF $\beta$  -inducible elements in the promoter

- of human plasminogen activator inhibitor type 1 gene. *EMBO J*. 1998 ; 17 : 3091-100.
7. Cho IJ, Kim SH, Kim SG. Inhibition of TGF $\beta$  1-mediated PAI-1 induction by oltipraz through selective interruption of Smad 3 activation. *Cytokines*. 2006 ; 35 : 284-94.
  8. Cho IJ, Kim YW, Han CY, Kim EH, Anderson RA, Lee YS, Lee CH, Hwang SJ, Kim SG. E-cadherin antagonizes transforming growth factor  $\beta$  1 gene induction in hepatic stellate cells by inhibiting RhoA-dependent Smad3 phosphorylation. *Hepatology*. 2010 ; 52 : 2053-64.
  9. The Korean Medical Dictionary Compilation Committee. *The Korean Medical Dictionary*. Seoul : Jungdam, 1998 : 727.
  10. Park SM, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Kim SC. Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated RAW 264,7 cells. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27 : 31-8.
  11. Jang MH, Kim H, Shin MC, Lim BV, Lee TH, Jung SB, Kim CJ, Kim EH. Administration of Folium *Mori* extract decreases nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol*. 2002 ; 90 : 189-92.
  12. Sugimoto M, Arai H, Tamura Y, Murayama T, Khaengkhan P, Nishio T, Ono K, Ariyasu H, Akamizu T, Ueda Y, Kita T, Harada S, Kamei K, Yokode M. Mulberry leaf ameliorates the expression profile of adipocytokines by inhibiting oxidative stress in white adipose tissue in b/db mice. *Atherosclerosis*. 2009 ; 204 : 388-94.
  13. Harauma A, Murayama T, Ikeyama K, Sano H, Arai H, Takano R, Kita T, Hara S, Kamei K, Yokode M. Mulberry leaf powder prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 ; 358 : 751-6.
  14. Sattayasai J, Tiamkao S, Puapairoj P. Biphasic effects of *Morus alba* leaves green tea extract on mice in chronic forced swimming model. *Phytother Res*. 2008 ; 22 : 487-92.
  15. Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. TGF beta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett*. 2001 ; 502 : 4-10.
  16. Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, Weinstein M, Deng C, Kucherlapati R, Bottinger EP, Roberts AB. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 ; 276 : 19945-53.
  17. Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*. 2000 ; 14 : 627-44.
  18. Liu X, Wang W, Hu H, Tang N, Zhang C, Liang W, Wang M. Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF-beta1 in cultured rat hepatic stellate cells. *Pharm Res*. 2006 ; 23 : 82-9.
  19. Kang KW, Kim YG, Cho MK, Bae SK, Kim CW, Lee MG, Kim SG. Oltipraz regenerates cirrhotic liver through CCAAT/enhancer binding protein-mediated stellate cell inactivation. *FASEB J*. 2002 ; 16 : 1988-90.
  20. Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*. 2003 ; 125 : 178-91.
  21. Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad 3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol*. 2001 ; 187 : 117-23.
  22. Doi K, Kojima T, Makino M, Kimura Y, Fujimoto Y. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001 ; 49 : 151-3.
  23. Hernández-Ortega LD, Alcántar-Díaz BE, Ruiz-Corro LA, Sandoval-Rodríguez A, Bueno-Topete M, Armendariz-Borunda J, Salazar-Montes AM. Quercetin improves hepatic fibrosis reducing hepatic stellate cells and regulating pro-fibrogenic/anti-fibrogenic molecules balance. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 ; 27 : 1865-72.
  24. Marcolin E, San-Miguel B, Vallejo D, Tieppo J, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr*. 2012 ; 142 : 1821-8.
  25. Kanter M. Protective effect of quercetin on liver damage induced by biliary obstruction in rats. *J Mol Histol*. 2010 ; 41 : 395-402.
  26. Lee HS, Jung KH, Park IS, Kwon SW, Lee DH, Hong SS. Protective effect of morin on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Dig Dis Sci*. 2009 ; 54 : 782-8.