



Original Article / 원저

## 淫羊藿 열수 추출물의 Smad 신호 억제를 통한 간성상세포의 활성화 조절

정지윤, 민병구<sup>1</sup>, 박정아, 변성희, 조일제, 김상찬\*

대구한의대학교 한의과대학, <sup>1</sup>충남대학교 약학대학

## *Epimedium koreanum* Nakai Water Extract Regulates Hepatic Stellate Cells Activation through Inhibition of Smad Signaling Pathway

Ji Yun Jung, Byung-Gu Min<sup>1</sup>, Chung A Park, Sung Hui Byun, Il Je Cho, Sang Chan Kim\*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University

### ABSTRACT

**Objectives** : In Traditional Korean Medicine, *Epimedium koreanum* Nakai has diverse pharmacological activities to treat impotence, forgetfulness, cataract and exophthalmos. Present study investigated anti-fibrogenic effects of *E. koreanum* water extract (EKE) in hepatic stellate cells (HSCs).

**Methods** : To study anti-fibrogenic effects of EKE, LX-2 cells, a human immortalized HSCs, were pre-treated with 3-300  $\mu\text{g/mL}$  of EKE, and then subsequently exposed to 5 ng/mL of transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1). Expression level of  $\alpha$ -smooth muscle actin was determined by immunoblot analysis. Phosphorylation of Smad, transactivation of Smad, and expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were monitored to investigate the effect of EKE on TGF- $\beta$  1-mediated signaling pathway.

**Results** : Up to 100  $\mu\text{g/mL}$ , EKE did not show any cytotoxicity on LX-2 cells. Pre-treatment of EKE (100  $\mu\text{g/mL}$ ) significantly inhibited  $\alpha$ -smooth muscle actin expression induced by TGF- $\beta$  1. In addition, EKE significantly decreased Smad2 and Smad3 phosphorylations, Smad binding element-driven luciferase activity and PAI-1 expression by TGF- $\beta$  1. Of three flavonoid compounds found in EKE, only quercetin (30  $\mu\text{M}$ ) attenuated TGF- $\beta$  1-mediated PAI-1 expression.

**Conclusion** : These results suggest that EKE has an ability to suppress fibrogenic process in HSCs via inhibition of TGF- $\beta$  1/Smad signaling pathway.

**Key words** : *Epimedium koreanum* Nakai, Hepatic stellate cells (HSCs), Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1), Smad, Quercetin.

## I. 서론

간섬유화 (liver fibrosis)는 반복된 간조직의 손상과 회복과정에서 세포외 교원질 (extracellular matrix)의 생성과 분해 사이의 불균형에 기인한 만성 간질환의 하나이며 활성화된 간성상세포 (hepatic stellate cell)가 간섬유화에 기여하는 주된 세포로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 정상적인 생리적 환경에서 간의 perisinusoidal space에 존재하는 휴지기 (quiescent) 간성상세포는 vitamin A를 저장하며 상피세포 (epithelial cell)의 표현형을 나타낸다<sup>2)</sup>. 그러나, 반복적이고 지속적인 간조직의 손상은 간성상세포의 vitamin A 저장능을 저하시키고, 세포 증식능과 신축성을 증가시켜 fibronectin과 collagen을 포함한 세포외 교원질을 분비하는 근섬유아세포 (myofibroblast)로 세포의 표현형을 변형시킨다<sup>3)</sup>. 더불어 활성화된 간성상세포는 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleukin-6, platelet-derived growth factor를 포함한 다양한 인자들을 분비하여 주변 휴지기 간성상세포를 활성화시키고, 염증반응을 통한 실질세포의 파괴와 세포외 교원질을 축적을 가속화하여 비가역적 간질환인 간경화 (cirrhosis)로 이행하는데 관여한다<sup>2,3)</sup>.

간성상세포의 활성화과정에 관여하는 다양한 인자들 중 TGF- $\beta$ 는 세포막에 존재하는 TGF- $\beta$  수용체를 활성화시켜 세포질에 존재하는 receptor-activated Smad (예, Smad2, Smad3)의 인산화를 촉진한다. 또한 인산화된 receptor-activated Smad는 co-Smad (예, Smad4)와 복합체를 형성하여 핵으로 이동하고, 5'-CAGA-3' 서열을 포함하는 Smad binding element (SBE) 영역에 결합하여 세포외 교원질 축적에 관여하는 단백질들의 발현을 증가시킨다<sup>4,5)</sup>. 따라서, 가역적인 간섬유화 단계에서 TGF- $\beta$ 를 중심으로 한 간성상세포의 활성화를 제어하는 것이 간경화 또는 간암으로의 이행을 억제하는 중요한 치료 전략의 하나

로 인식되고 있다.

陽痿精衰에 사용되는 贊育丹<sup>6)</sup>, 輕身健力하는 延壽甕頭春<sup>7)</sup>, 一切風熱內外障膜眼疾에 사용되는 重明散<sup>8)</sup>, 食毒物後睛凸出을 치료하는 二仙散, 風毒上攻을 치료하는 透水丹<sup>9)</sup> 등의 다양한 처방에 활용되는 淫羊藿은 우리나라를 중심으로 분포하는 다년생 초본식물로서 肝, 命門에 주로 작용하는 약재이다<sup>10)</sup>. 따라서 한의학에서 淫羊藿은 肝經과 관련된 輕身延命 및 眼睛, 內外障膜을 포함한 질환 치료에 전통적으로 활용되었으나, 간질환과 직접 관련된 효능에 대한 연구는 상대적으로 부족하였다. 본 연구실의 선행연구를 통하여 淫羊藿 열수 추출물이 nuclear factor erythroid 2-related factor 2의 활성화를 통하여 산화적 스트레스로부터 간실질세포와 간 조직을 보호하고, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 억제를 통하여 대식세포에 의한 염증반응을 억제할 수 있음을 최초로 규명하였다<sup>11,12)</sup>. 이에 본 연구에서는 淫羊藿 열수 추출물이 간섬유화 과정에 관여하는 간성상세포의 활성을 억제할 수 있는지 여부와 이와 관련된 약리기전을 규명하고자 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

세포 배양을 위한 fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium, Williams' media E, L-glutamine, penicillin-streptomycin은 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. TGF- $\beta$ 1과 anti-plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 항체는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)와 Santa Cruz Biotechnology (Santacruz, CA, USA)에서 각각 구입하였다. Anti-phospho-Smad2, anti-phospho-Smad3, anti-Smad2/3 항체와 horseradish peroxidase가 결합된 이차 항체는 Cell Signaling

\*Corresponding author : Sang Chan Kim, Department of Herbal formulation, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel: +82-53-819-1861, Fax: +82-53-819-1860, E-mail: sckim@dhu.ac.kr

• Received : March 20, 2018 / Revised : July 18, 2018 / Accepted : July 23, 2018



Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), icariin, icaritin, quercetin, anti- $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), anti- $\beta$ -actin 항체 및 기타 시약류는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

## 2. 淫羊藿 열수 추출물 (*E. koreanum* Nakai water extract; EKE)의 제조

淫羊藿은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하여 선형 보고된 방법에 따라 열수 추출물을 제조하였으며<sup>11)</sup>, 100 mg/mL의 농도로 물에 용해하여 0.22  $\mu$ m syringe filter (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과 후 실험에 이용하였다.

## 3. 세포배양 및 약물 처치

인체 유래 간 정상세포주인 LX-2 세포는 Dr. S. L. Friedman (Mount Sinai School of Medicine, NY, USA)으로부터, 랫트 유래 간 정상세포주인 *t*-HSC/Cl6 세포는 원광대학교 손동환 교수로부터 제공받았다. LX-2 세포는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 배양하였고, *t*-HSC/Cl6 세포는 FBS와 항생제, L-glutamine이 포함된 Williams' media E를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 바닥면적의 80% 이상 성장한 각 세포는 FBS가 포함되지 않는 배지로 교환하여 4시간 동안 추가 배양한 후, 5 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1, 3-300  $\mu$ g/mL의 EKE, 30  $\mu$ M의 icariin, icaritin 또는 quercetin을 실험 목적에 따라 처치하였다.

## 4. 세포 생존율 측정

LX-2 세포를 24 well plate에 4 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 배양한 후, 3-300  $\mu$ g/mL의 EKE 또는 30  $\mu$ M의 icariin, icaritin 및 quercetin을 24 시간 동안 각각 처치하였다. 1 mg/mL의 MTT 용액과 2시간 동안 반응시켜 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide로 용해한 후 570 nm에서 흡광도를 microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로 측정하였다. 상대적인 세포 생존율은 무처리 대조세포에 대한 백분율로 나타내었다.

## 5. 전세포 추출액 제조 및 immunoblot analysis

처치가 완료된 세포로부터의 전세포 추출액 (whole cell lysates)의 제조와 immunoblot 분석은 본 연구실의 기 확립된 방법에 따라 수행하였다<sup>11)</sup>. 즉, 세포를 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor들이 포함된 radioimmunoprecipitation assay buffer로 용해하고 원심분리하여 전세포 추출액을 제조하였다. Bicinchoninic acid protein assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)로 정량한 동량의 전세포 추출액을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 분자량에 따라 분리한 후, nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. Membrane을 1차 항체, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체, enhanced chemiluminescence detection reagents (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)와 순차적으로 반응시킨 후 Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)을 이용하여 발색하였다. 각 단백질의 발현량은 ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>)를 이용하여 분석하였으며  $\beta$ -actin 또는 smad2/3의 발현량으로 보정하여 상대 정량하였다.

## 6. 플라스미드 제작, 재조합 세포주의 확립 및 리포터 유전자 분석

SBE를 포함한 pGL4.48[luc2p/SBE/Hygro]와 pGL4.15 플라스미드는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. pGL-B-phPAI1-798 플라스미드를 주형으로 human *PAI-1* promoter의 -798 bp에서 +65 bp를 포함하는 유전자 단편을 polymerase chain reaction (PCR)으로 증폭한 후<sup>13)</sup>, pGL4.15 플라스미드의 *KpnI/BglII* 영역에 삽입하여 pGL4.15-phPAI1-798을 제작하였다. *t*-HSC/Cl6 세포에 Fugene HD (promega)를 이용하여 pGL4.48[luc2p/SBE/Hygro]와 pGL4.15-phPAI1-798 플라스미드를 각각 형질도입한 후 50  $\mu$ g/mL의 hygromycin (Life Technologies)을 처치하여 플라스미드를 안정적으로 발현하는 항생제 내성 colony를 선별하여 SBE 또는 human *PAI-1* promoter로 조절되는 luciferase를 안정적으로 발현하는 재조합 세포주를 확립하였다. 12-well plate에 배양된 재조합 세포주에 30-100  $\mu$ g/mL의 EKE를 1시간 전처리한 후, 5 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1을 24시간 동안 처치하였다. Luciferase 활성은 Passive lysis buffer (Promega)로 용해한 세포 용해액과 luciferin을 반응시켜 microplate

reader (Infinite M200 pro)로 측정하였다. 각 샘플별 luciferase 활성은 세포 용해액의 단백질 함량으로 보정하였다.

#### 7. Total RNA 분리와 real-time PCR 분석

LX-2 세포로부터 total RNA는 TRI-solution (Bioscience technology, Seoul, Korea)을 이용하여 분리하였으며, total RNA (0.5-1 µg), d(T)<sub>16</sub>, Accupower RT premix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 SYBR Ex Taq (TaKaRa, Shiga, Japan)과 CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. Real-time PCR 분석을 위한 primer로 PAI-1 (sense, 5'-TCGTCCAGCGGGATCTGA-3'; anti-sense, 5'-CCTGGTCATGTTGCCTTTC-3'), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; anti-sense, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3')를 Bioneer에서 합성하였다. 각 샘플별 PAI-1 유전자의 발현량은 GAPDH 유전자의 발현량을 기준으로 2<sup>-DDCT</sup>법에 의해 상대 정량하였다<sup>14)</sup>.

#### 8. 통계적 검증

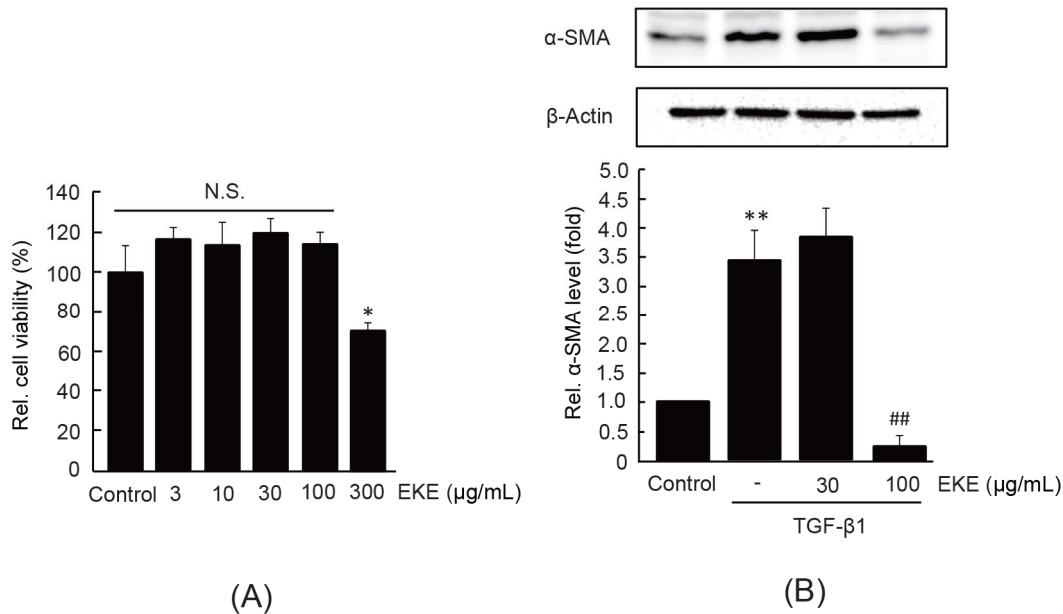
모든 데이터는 3 회 반복 시행 후 mean ± SD로 표기하였으며, 각 그룹간 통계적 유의성은 one way analysis of variance 분석을 수행한 후, 등분산 가정의 성립 여부에 따라 Tukey honestly significant difference test 또는 Dunnett T3 test로 사후 검정하였다. 통계적 유의성은 P 값이 0.05 또는 0.01 미만을 기준으로 검정하였다.

### III. 결과

#### 1. EKE가 TGF-β1으로 활성화된 LX-2 세포에서 α-SMA 발현에 미치는 영향

EKE가 간성상세포의 세포생존율에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 인체 유래 간성상세포주인 LX-2 세포에 3-300 µg/mL의 EKE를 24시간 동안 처치한 후 MTT assay를 수행하였다. 3-100 µg/mL의 EKE 처치는 LX-2 세포의 생존율을 변화시키지 않았으나, 300 µg/mL의 EKE 처치는 LX-2 세포의 생존율을 무처리 대조세포와 비교하여 70.37 ± 4.34%로 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Fig. 1A). 따라서 LX-2 세포에서 독성을 나타내지 않았던 30 또는 100 µg/mL의 EKE를 이용하여 후속 연구를 수행하였다.

정상 간조직에 존재하는 간성상세포는 상피세포의 표현형을 가지고 있으나, TGF-β 자극은 간성상세포를 중배엽성 근섬유아세포로 변형시키며 α-SMA의 발현이 유도된다<sup>15)</sup>. EKE가 α-SMA 발현에 미치는 영향을 연구하기 위하여 LX-2 세포에 30-100 µg/mL의 EKE를 1시간 동안 전처리한 후 5 ng/mL의 TGF-β1을 24시간 동안 처치하였다. LX-2 세포에서 TGF-β1의 처치는 α-SMA의 발현을 무처리 대조세포와 비교하여 3.41 ± 0.53배 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 30 µg/mL의 EKE 전처치는 TGF-β1에 의한 α-SMA 발현을 변화시키지 못하였으나, 100 µg/mL의 EKE 전처치는 α-SMA 발현을 0.21 ± 0.20배로 TGF-β1 단독 처치군과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Fig. 1B). 이상의 결과는 EKE가 TGF-β1에 의한 간성상세포의 활성화를 억제할 수 있음을 나타낸다.

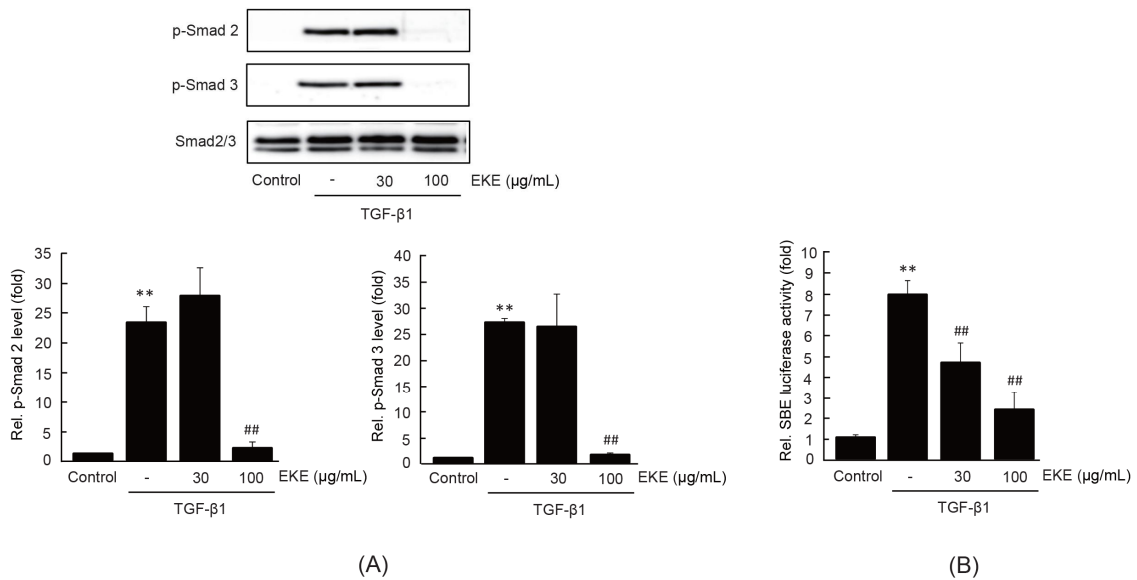


**Fig. 1.** The effects of EKE on TGF-β1-induced HSCs activation. (A) Cell viability. LX-2 cells were treated with 3–300 μg/mL of EKE for 24 h. Relative cell viabilities were determined by MTT assay. (B) α-SMA expression. LX-2 cells were pre-treated with EKE (30 or 100 μg/mL) for 1 h and subsequently exposed to TGF-β1 (5 ng/mL) for 24 h (upper). Relative levels of α-SMA expression were quantified by scanning densitometry (lower). Significant vs untreated control, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; significant vs TGF-β1 alone, ## $P < 0.01$ ; N.S., not significant.

## 2. EKE가 TGF-β1 유도성 Smad 활성화에 미치는 영향

Smad는 TGF-β1에 의하여 활성화되는 대표적인 전사인자이다<sup>4)</sup>. EKE가 TGF-β1에 의한 세포 내 신호 전달 과정에 미치는 영향을 연구하기 위하여 Smad2와 Smad3의 인산화를 immunoblot 분석을 통하여 관찰하였다. LX-2 세포에서 30분 동안의 5 ng/mL의 TGF-β1 자극은 Smad2와 Smad3의 인산화를 무처리 대조세포와 비교하여 각각  $23.18 \pm 2.70$ 배와  $29.39 \pm 0.84$ 배 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 30 μg/mL의 EKE 전처리는 TGF-β1 자극에 의한 Smad2와 Smad3의 인산화를 변화시키지 못하였으나, 100 μg/mL의 EKE 전처리는 Smad2와 Smad3의 인산화를 대조세포 수준으로 통계적으로 유의하게 억제하였다 (Fig. 2A). EKE가 TGF-β1에 의한 Smad

전사활성화에 미치는 영향을 연구하기 위하여 SBE에 의해 조절되는 luciferase를 안정적으로 발현하는 *t*-HSC/Cl6 세포에 30–100 μg/mL의 EKE를 1시간 동안 전처리한 후, 5 ng/mL의 TGF-β1을 24시간 동안 처리하였다. 예상했던 바와 같이, 24시간 동안의 TGF-β1 자극은 SBE에 의한 luciferase 활성을 무처리 대조세포와 비교하여  $7.95 \pm 0.68$ 배 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 30–100 μg/mL의 EKE 전처리는 TGF-β1에 의한 증가한 luciferase 활성을 농도 의존적으로 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 30과 100 μg/mL의 EKE 전처리에 의한 luciferase 활성은 각각  $4.66 \pm 0.96$ ,  $2.34 \pm 0.85$ 배였다 (Fig. 2B). 이상의 결과는 EKE가 TGF-β1에 의한 Smad 신호 분자의 억제를 통하여 간성상세포의 활성화를 제어할 수 있음을 나타낸다.



**Fig. 2.** The effect of EKE on TGF- $\beta$ 1-mediated Smad activation. (A) Smad phosphorylation. LX-2 cells pre-treated with EKE (30 or 100  $\mu$ g/mL, 1 h) were further exposed to TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) for 0.5 h. Equal protein loadings were verified by Smad2/3 immunoblotting (upper). Levels of phosphorylated Smad2 and Smad3 were determined by scanning densitometry (lower). (B) SBE transactivation. Recombinant *t*-HSC/Cl6 cells which express pGL4.48 were treated with EKE and TGF- $\beta$ 1, as described in figure 1(B). Significant vs untreated control, \*\* $P$  < 0.01; significant vs TGF- $\beta$ 1 alone, ## $P$  < 0.01.

### 3. EKE 및 지표성분이 TGF- $\beta$ 1 유도성 PAI-1 발현에 미치는 영향

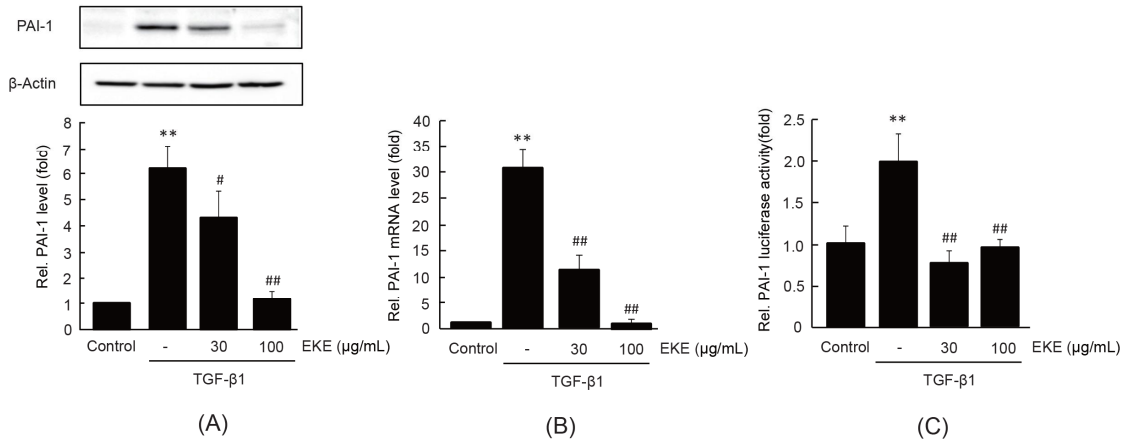
PAI-1은 간성상세포에서 TGF- $\beta$ 1에 의하여 유도되는 대표적인 표적 유전자 중 하나이다<sup>13)</sup>. EKE가 TGF- $\beta$ 1 유도성 표적 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하기 위하여 PAI-1의 단백질, mRNA 및 전사활성화를 immunoblot, real-time PCR 및 리포터 유전자 분석을 통하여 관찰하였다. LX-2 세포에서 TGF- $\beta$ 1 자극은 PAI-1 단백질 및 mRNA를 무처리 대조세포와 비교하여 각각  $6.20 \pm 0.89$ 배와  $30.97 \pm 2.41$ 배 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 30-100  $\mu$ g/mL의 EKE 전처치는 TGF- $\beta$ 1에 의한 증가한 PAI-1 단백질 및 mRNA를 농도 의존적으로 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 30과 100  $\mu$ g/mL의 EKE 전처치에 의한 PAI-1 단백질은 각각  $4.32 \pm 1.03$ ,  $1.17 \pm 0.31$ 배였으며, PAI-1 mRNA는 각각  $11.19 \pm 1.01$ ,  $1.01 \pm 0.17$ 배였다 (Figs. 3A and 3B). EKE가 TGF- $\beta$ 1에 의한 PAI-1 전사활성화에 미치는 영향을 연구하기 위하여 PAI-1 promoter를 포함하는

luciferase를 안정적으로 발현하는 재조합 *t*-HSC/Cl6 세포에 30-100  $\mu$ g/mL의 EKE와 5 ng/mL의 TGF- $\beta$ 1을 처리하였다. PAI-1 단백질, mRNA 결과와 유사하게 30-100  $\mu$ g/mL의 EKE 전처치는 TGF- $\beta$ 1에 의한 증가한 luciferase 활성을 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Fig. 3C).

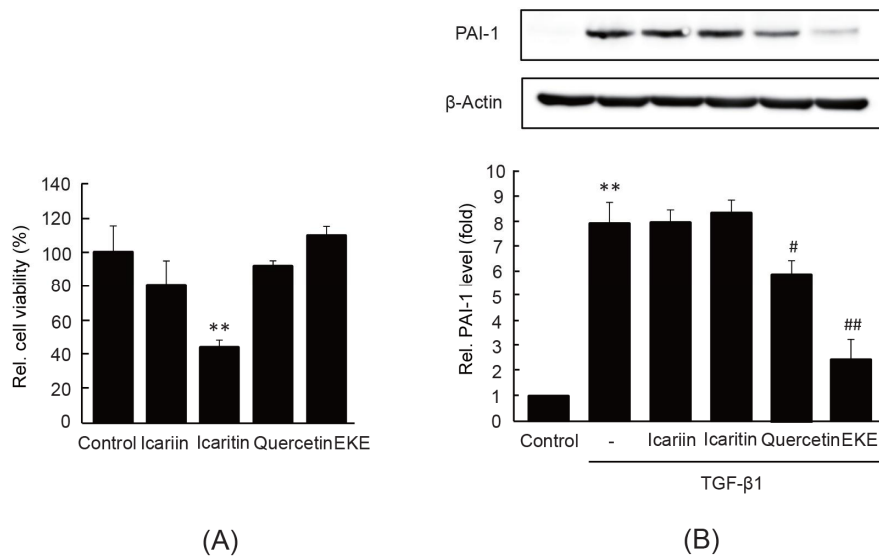
선행 연구에서 3종의 flavonoid 화합물인 icariin, icaritin 및 quercetin이 EKE에 함유되어 있음을 보고하였다<sup>11)</sup>. LX-2 세포에 24시간 동안의 icariin, icaritin 또는 quercetin (각 30  $\mu$ M) 처리에 의한 세포 생존율의 변화를 관찰하였다. 30  $\mu$ M의 icariin, quercetin의 처리는 세포 생존율을 변화시키지 않았으나, icaritin은 LX-2 세포의 생존율을 무처리 대조 세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 감소시켰다 (Fig. 4A). EKE에 의한 PAI-1 발현 제어에 있어 3종의 flavonoid 화합물의 관련성을 연구하기 위하여 30  $\mu$ M의 flavonoid 화합물을 전처치한 LX-2세포에서의 PAI-1 발현을 immunoblot 분석으로 확인하였다. 3종의 flavonoid 화합물 중 quercetin 전처치만

이 TGF- $\beta$ 1에 의한 증가한 PAI-1 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였다 (Fig. 4B). 이상의 결과는 EKE 또는 EKE에 함유된 quercetin이 TGF- $\beta$ 1에

의하여 유도된 PAI-1 발현을 전사적 조절을 통하여 억제할 수 있음을 나타낸다.



**Fig. 3.** The effect of EKE on TGF- $\beta$ 1-mediated PAI-1 induction. LX-2 and recombinant *t*-HSC/C16 cells which express pGL4.15-phPAI1-798 were pre-treated with EKE (30 or 100  $\mu$ g/mL) for 1 h and further exposed to TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) for 6 h (B) or 24 h (A and C). PAI-1 protein (A), mRNA (B), and the gene transactivation (C) were determined by immunoblot, real-time PCR, and reporter gene analyses, respectively. Significant vs untreated control, \*\* $P$  < 0.01; significant vs TGF- $\beta$ 1 alone, # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01.



**Fig. 4.** The effect of three flavonoids on TGF- $\beta$ 1-mediated PAI-1 induction. LX-2 cells were pre-treated with icariin (30  $\mu$ M), icaritin (30  $\mu$ M), quercetin (30  $\mu$ M), or EKE (100  $\mu$ g/mL) for 1 h and then exposed to TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) for 24 h. Cell viability (A) and levels of PAI-1 expression (B) were determined by MTT and immunoblot analyses, respectively. Significant vs untreated control, \*\* $P$  < 0.01; significant vs TGF- $\beta$ 1 alone, # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01.

#### IV. 고찰

현대 의과학적 연구를 통하여淫羊藿이 NF- $\kappa$ B와 matrix metalloproteinase-9의 활성의 조절을 통하여 phorbol 12-myristate 13-acetate로 유도한 A172 glioma 세포의 전이와 침윤을 억제할 수 있음이 보고되었다<sup>16)</sup>. 또한淫羊藿에서 추출한 icariside II는 Akt와 NF- $\kappa$ B의 억제를 통해 non-small cell lung cancer의 epithelial-mesenchymal transition (EMT)을 억제하며, baohuoside I은 CXC chemokine receptor 4의 발현 억제를 통하여 자궁경부암세포와 유방암세포의 침윤을 억제할 수 있음이 보고되었다<sup>17,18)</sup>. 이들 선행 연구에서 제시한 암세포의 EMT 제어와 관련된 신호분자들은 간성상세포의 활성화 과정에서도 유사하게 적용되는 분자이므로淫羊藿이 간성상세포의 활성화를 억제할 수 있는 가능성을 제시한다. 그러나,淫羊藿이 간성상세포의 활성을 직접적으로 조절할 수 있는지 여부와 이와 관련된 약리기전에 대한 연구는 상대적으로 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 한의학에서 연구가치가 높은淫羊藿 열수추출물, EKE의 간성상세포 활성화 제어와 관련된 효능과 약리기전을 규명하고자 우선 EKE가 인체 유래 간성상세포주인 LX-2 세포의 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. LX-2 세포에 3-300  $\mu$ g/mL의 EKE를 24시간 동안 처치하고 MTT assay로 세포 생존율을 확인한 결과, 100  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서 EKE는 LX-2 세포의 생존율에 영향을 끼치지 않음을 확인하였다.

간성상세포에서의 TGF- $\beta$ 1 자극은 EMT를 통하여  $\alpha$ -SMA를 발현하는 증배엽성 근섬유아세포로 세포의 표현형을 변화시켜 간성상세포의 활성화를 촉진한다<sup>15)</sup>. 따라서 본 연구에서는 LX-2 세포의 생존율에 변화를 나타내지 않았던 30-100  $\mu$ g/mL의 EKE를 전처치한 후 TGF- $\beta$ 1에 의한 간성상세포의 활성화를  $\alpha$ -SMA 발현으로 관찰하였다. 100  $\mu$ g/mL의 EKE 전처치는 TGF- $\beta$ 1에 의한  $\alpha$ -SMA 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였으므로, EKE가 TGF- $\beta$ 1에 의한 간성상세포의 EMT를 억제할 수 있는 가능성을 시사한다. 간성상세포에서 TGF- $\beta$ 1에 의해 활성화되는 대표적인 신호 전달 과정은 전사인자로 작용하는 Smad의 활성화이다<sup>4)</sup>. 따라서, TGF- $\beta$ 1 의존적 신호조절 과정을 억제하는지 여부를 연구하기 위하여 LX-2 세포에 30-100  $\mu$ g/mL의 EKE를 전처치한

결과, TGF- $\beta$ 1에 의하여 증가한 Smad2와 Smad3의 인산화가 100  $\mu$ g/mL의 EKE 처치에 의하여 억제됨을 확인하였다. 더불어 SBE에 의해 조절되는 reporter 유전자를 안정적으로 발현하는 *t*-HSC/Cl6 세포에서도 30-100  $\mu$ g/mL의 EKE 전처치는 농도 의존적으로 TGF- $\beta$ 1에 의하여 증가한 리포터 유전자 활성을 억제하였다. 본 연구에서 30  $\mu$ g/mL의 EKE 전처치는 TGF- $\beta$ 1에 의하여 활성화된  $\alpha$ -SMA 발현과 Smad2/3의 인산화는 변화되지 못하였으나, SBE 리포터 유전자 활성을 억제할 수 있음을 확인하였다. 이 결과는 연구방법 (예, 리포터 유전자 분석과 immunoblot 분석)과 세포주 (예 LX-2와 *t*-HSC/Cl6 세포)의 민감도에 따라 상이한 차이를 나타낸 것으로 생각되며, 본 연구 결과로 미루어 30  $\mu$ g/mL의 EKE가 항섬유화 효능을 나타내는 경계 농도에 해당되는 것으로 추정된다.

본 연구에서 EKE의 전처치는 TGF- $\beta$ 1에 의하여 증가한 PAI-1 mRNA, 단백질 및 전사활성화를 억제하였다. PAI-1, type I collagen, tissue inhibitor of metalloproteases-1은 활성화된 Smad에 의해 발현이 증가되어 간 조직 내 세포의 교원질의 축적에 관여하는 대표적인 표적 유전자이다<sup>5,13,19,20)</sup>. 이중 serine protease inhibitor의 일종인 PAI-1은 tissue-type 또는 urokinase-type의 plasminogen activator에 대한 내인적 억제 단백질로서 혈관 내 plasmin의 과잉 생성 억제의 역할 뿐 아니라, 조직재생과 섬유화 과정에서 fibrin의 축적을 유도한다<sup>21,22)</sup>, 간섬유화와 관련된 선행연구로서 PAI-1 결손시 Bile duct ligation에 의한 세포의 교원질 축적이 억제될 수 있음이 제시되었으며, tissue-type plasminogen activator의 활성 증가와 항섬유화 싸이토카인 작용이 있는 활성화형 hepatocyte growth factor의 발현 증가가 포함되어 보고되었다<sup>23)</sup>. 더불어 PAI-1 발현을 조절할 수 있는 siRNA의 도입은 간성상세포의  $\alpha$ -SMA를 감소시키고 세포의 교원질 축적에 관여하는 TGF- $\beta$ 1, tissue inhibitor of metalloprotease, collagen 등의 발현을 억제할 수 있음이 보고되었다<sup>24)</sup>. 따라서 Smad의 활성 제어뿐 아니라 PAI-1의 발현 감소도 EKE에 의한 간성상세포의 활성화를 억제하는데 기여할 것으로 생각된다.

EKE (100  $\mu$ g/mL)에 의한 PAI-1 감소 정도와 비교하여 상대적으로 약하지만, 본 연구에서는 3종의





flavonoid 화합물 중 quercetin (30  $\mu$ M)만이 TGF- $\beta$ 1에 의하여 증가한 PAI-1 단백질을 억제할 수 있음을 확인하였다. 본 연구실의 선행연구를 통하여 EKE에 icariin, icaritin 및 quercetin이 각각 83.64  $\pm$  4.17, 20.41  $\pm$  0.03 및 1.83  $\pm$  0.08 ppm 함유되어 있으며, 아라키돈산과 철에 의한 간실질세포의 사멸과 LPS에 의한 대식세포 염증반응을 3-30  $\mu$ M의 농도 범위 내에서 3종의 flavonoid가 억제할 수 있음을 보고하였다<sup>11,12)</sup>. 그러나 본 연구에서 정상세포 활성화의 최대 억제 활성을 나타내었던 100  $\mu$ g/mL의 EKE에 함유된 3종의 flavonoid의 농도는 본 연구에서 사용한 30  $\mu$ M과 비교하여 현저히 낮다. 따라서 EKE에 의한 항섬유화 효능은 3종의 flavonoid와 EKE 내 동정되지 않는 다른 화합물의 복합작용에 의한 것으로 추정되며 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Quercetin은 CCl<sub>4</sub>와 bile duct ligation에 의하여 유도된 간섬유화를 억제할 수 있음이 보고되었으며 TGF- $\beta$ 1/Smad의 억제를 통한 정상세포의 활성화를 조절하고, phosphoinositide 3-kinase/Akt의 활성화를 통하여 자가포식작용을 억제할 수 있음이 규명되었다<sup>25)</sup>. 더불어 quercetin은 CCl<sub>4</sub>에 의한 NF- $\kappa$ B와 p38 mitogen-activated protein kinase의 인산화를 억제하고, high mobility group box 1과 toll-like receptor 2와 toll-like receptor 4 발현을 억제하며, 간섬유화 과정에서의 염증반응과 간실질세포의 세포자멸사를 조절할 수 있음이 보고되었다<sup>26,27)</sup>. Icarin은 thioacetamide에 의해 유도된 간섬유화 동물모델에서 자가포식작용과 혈관신생작용의 억제를 통하여 간섬유화를 억제할 수 있음이 보고되었다<sup>28)</sup>. 더불어 icaritin은 CCl<sub>4</sub>와 bile duct ligation에 의하여 유도된 간섬유화를 억제할 수 있음이 보고되었으며, 이 과정에 미토콘드리아 의존적으로 활성화된 간성상세포의 세포자멸사 유도가 관여함이 규명되었다<sup>29)</sup>. 특히 Li 등 (2011)의 연구에서 48시간 동안의 icaritin 처치에 의한 LX-2 세포 생존율의 IC<sub>50</sub>가 24.1  $\mu$ M로 보고하였으며<sup>29)</sup>, 본 연구에서도 30  $\mu$ M의 icaritin이 LX-2 세포의 생존율을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 icariin과 icaritin은 TGF- $\beta$ 1/Smad 비의존적 세포 내 신호전달 과정의 제어 또는 간성상세포 이외의 다른 세포들의 활성 제어를 통해 항섬유화 효능을 나타낸 것으로 추정되며

이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결론

TGF- $\beta$ 1으로 활성화된 간성상세포에서淫羊藿 열수 추출물의 효능 및 세포 내 신호 분자에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TGF- $\beta$ 1으로 활성화된 간성상세포에서淫羊藿 열수 추출물의 전처치는  $\alpha$ -SMA의 발현을 억제하였다.
2. TGF- $\beta$ 1으로 활성화된 간성상세포에서淫羊藿 열수 추출물의 전처치는 Smad2와 Smad3의 인산화를 억제하고, SBE를 포함한 리포터 유전자 활성을 억제하였다.
3. TGF- $\beta$ 1으로 활성화된 간성상세포에서淫羊藿 열수 추출물의 전처치는 PAI-1의 발현을 전사적 수준에서 억제하였으며,淫羊藿 열수 추출물에 함유된 quercetin 또한 PAI-1 발현을 억제하였다.

따라서淫羊藿 열수 추출물이 TGF- $\beta$ 1/Smad 신호분자의 억제를 통하여 간성상세포의 활성화를 제어할 수 있음을 규명하였다. 따라서淫羊藿과 관련된 후속 연구가 지속적으로 수행된다면淫羊藿을 급만성 간질환 치료 方劑의 신규 本草로서 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2012R1A5A2A42671316)

## References

1. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. Arch Pathol Lab Med. 2007;131:1728-34.
2. Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. J Gastroenterol Hepatol. 2006;21:S84-7.
3. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005;115:209-18.
4. Yoshida K, Murata M, Yamaguchi T, Matsuzaki

- K, Okazaki K. Reversible Human TGF- $\beta$  signal shifting between tumor suppression and fibro-carcinogenesis: implications of smad phospho-Isoforms for hepatic epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Med.* 2016;5:7.
5. 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.
  6. Choi DY, Kim JG, Yeom YH. *New Comprehension on Jingyue Herbal Formulation.* 1st Ed. Seoul:Bubin publisher. 2004:445.
  7. Gong TX. *Shoushibaoyuan.* 1st Ed. Beijing: Zhongguozhongyiyao publisher. 1993:445.
  8. Yu B. *Yixuezhengchaun.* 1st Ed. Seoul:Seongbosa. 1986:234.
  9. Heo J. *Dongeuibogam.* 1st Ed. Seoul:Namsandang. 1966:367, 667.
  10. Lee SI. *Herbology.* Seoul:Suseowon. 1981:71-72.
  11. Jung JY, Park SM, Ko HL, Lee JR, Park CA, Byun SH, Ku SK, Cho IJ, Kim SC. *Epimedium koreanum* Nakai water extract ameliorates oxidative stress-mediated liver injury by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Am J Chin Med.* 2018;46:469-88.
  12. Jung JY, Byun SH, Park CA, Cho IJ, Kim SC. Anti-inflammatory effects of *Epimedium koreanum* Nakai water extract through inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol.* 2018;33:19-28.
  13. Cho IJ, Kim SH, Kim SG. Inhibition of TGF $\beta$  1-mediated PAI-1 induction by oltipraz through selective interruption of Smad 3 activation. *Cytokine.* 2006;35:284-94.
  14. Kim JK, Lee JE, Jung EH, Jung JY, Jung DH, Ku SK, Cho IJ, Kim SC. Hemistepsin A ameliorates acute inflammation in macrophages via inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B and activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Food Chem Toxicol.* 2018;111:176-88.
  15. Choi SS, Omenetti A, Witek RP, Moylan CA, Syn WK, Jung Y, Yang L, Sudan DL, Sicklick JK, Michelotti GA, Rojkind M, Diehl AM. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297:G1093-106.
  16. Lee W, Nam JH, Cho HJ, Lee JY, Cho WK, Kim Y, We YM, Ma JY, Hoe HS. *Epimedium koreanum* Nakai inhibits PMA-induced cancer cell migration and invasion by modulating NF- $\kappa$ B/MMP-9 signaling in monomorphic malignant human glioma cells. *Oncol Rep.* 2017;38:3619-31.
  17. Song J, Feng L, Zhong R, Xia Z, Zhang L, Cui L, Yan H, Jia X, Zhang Z. Icariside II inhibits the EMT of NSCLC cells in inflammatory microenvironment via down-regulation of Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol Carcinog.* 2017;56:36-48.
  18. Kim B, Park B. Baohuoside I suppresses invasion of cervical and breast cancer cells through the downregulation of CXCR4 chemokine receptor expression. *Biochemistry.* 2014;53:7562-9.
  19. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF- $\beta$  /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem.* 2001;276:17058-62.
  20. Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF- $\beta$ : involvement of Smad 3. *J Invest Dermatol.* 1999;112:49-57.
  21. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* 2012;227:493-507.
  22. Matsuo S, López-Guisa JM, Cai X, Okamura DM, Alpers CE, Bumgarner RE, Peters MA, Zhang G, Eddy AA. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int.* 2005;67:2221-38.



23. Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO. PAI-1 deficiency reduces liver fibrosis after bile duct ligation in mice through activation of tPA. *FEBS Lett.* 2007;581:3098-104.
24. Hu PF, Zhu YW, Zhong W, Chen YX, Lin Y, Zhang X, Yin C, Yue HY, Xie WF. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 expression by siRNA in rat hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:1917-25.
25. Wu L, Zhang Q, Mo W, Feng J, Li S, Li J, Liu T, Xu S, Wang W, Lu X, Yu Q, Chen K, Xia Y, Lu J, Xu L, Zhou Y, Fan X, Guo C. Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF- $\beta$ 1/Smads and PI3K/Akt pathways. *Sci Rep.* 2017;7:9289.
26. Wang R, Zhang H, Wang Y, Song F, Yuan Y. Inhibitory effects of quercetin on the progression of liver fibrosis through the regulation of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , p38 MAPK, and Bcl-2/Bax signaling. *Int Immunopharmacol.* 2017;47:126-33.
27. Li X, Jin Q, Yao Q, Xu B, Li Z, Tu C. Quercetin attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in mice through modulation of HMGB1-TLR2/4-NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Toxicol Lett.* 2016;261:1-12.
28. Algandaby MM, Breikaa RM, Eid BG, Neamatallah TA, Abdel-Naim AB, Ashour OM. Icaritin protects against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: Implication of anti-angiogenic and anti-autophagic properties. *Pharmacol Rep.* 2017;69:616-24.
29. Li J, Liu P, Zhang R, Cao L, Qian H, Liao J, Xu W, Wu M, Yin Z. Icaritin induces cell death in activated hepatic stellate cells through mitochondrial activated apoptosis and ameliorates the development of liver fibrosis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2011;137:714-23.