

원저

茵蔯清肝湯加味方이 간조직의 섬유화 억제에 미치는 영향

강경태, 김영철, 이상훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Inhibitory Effect of *Injinchunggantang*-derivative on Hepatic Fibrosis

Kyung-Tae Kang, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo

Department of Internal Medicine, Collegel of Oriental Medicine, Kyunghee University

Objective : The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of *Injinchunggantang*-derivative on acute and sub-acute hepatic fibrosis induced by CCl₄, and to compare the efficiency of *Injinchunggantang*-derivative, *Salviae Radix* and *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* on acute and sub-acute hepatic fibrosis induced by CCl₄.

Method : Western blotting for collagen type IV, quantitative RT-PCR and gross & histological findings on liver tissue (Hematoxylin & Eosin stain, Reticulin stain, Masson-Trichrome stain) were studied.

Results : In the study on collagen type IV expression, *Injinchunggantang*-derivative, *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* and *Salviae Radix* showed inhibitory effect in western blotting. In quantitative RT-PCR assay, *Injinchunggantang*-derivative showed inhibitory effect on collagen type IV expression in acute hepatic fibrosis model, whereas *Injinchunggantang*-derivative, *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* and *Salviae Radix* showed inhibitory effect on collagen type IV expression in sub-acute hepatic fibrosis model.

In the gross findings of acute and sub-acute hepatic fibrosis models, *Injinchunggantang*-derivative, *Salviae Radix* and *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* showed inhibitory effect on hepatic fibrosis in the order.

In the histological findings of acute and sub-acute hepatic fibrosis models in Hematoxylin & Eosin, Reticulin and Masson-Trichrome staining, the liver of CCl₄-only group showed atrophy and necrotic change with white nodules whereas that of CCl₄+*Injinchunggantang*-derivative showed no significant histological change with well preservation of the tone of the tissue, and *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* and *Salviae Radix* group showed minimal fibrotic changes.

In the scoring system of the extent of the inhibition of the hepatic fibrosis, *Injinchunggantang*-derivative group showed statistically significant inhibitory effect (P<0.05) whereas *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* and *Salviae Radix* group showed no statistically significant effect in the acute hepatic fibrosis model.

In the sub-acute hepatic fibrosis model, *Injinchunggantang*-derivative, *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* and *Salviae Radix* group showed statistically significant effect (P<0.01).

Conclusion : These results show that *Injinchunggantang*-derivative, *Salviae Radix* and *Scirpi Tuber · Zeloariae Rhizoma* have inhibitory effect in the order on hepatic fibrosis induced by CCl₄ by suppressing the expression of collagen type IV, ultimately preventing liver cirrhosis. To obtain more credible results in this experiment, development of a new experimental model more similar to human hepatic fibrosis is still needed. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(2):39-56)

Key Words: *Injinchunggantang*-derivative, hepatic fibrosis, collagen type IV, CCl₄

· 접수 : 2001년 11월 20일 · 채택 : 2002년 3월 20일
· 교신저자 : 우홍정, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료
원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 958-9118, Fax. 958-9120, E-mail.
hjwoo@khmc.or.kr)

서 론

B형간염 바이러스의 감염은 우리 나라 인구의 6~7%에 이르고 있고, C형간염도 점점 증가하고 있는 추세이다^{1,3)}. 간염이 만성화함에 따라 반복되는 간세포 괴사 후의 미만성 섬유조직의 증식과 재생결절의 형성으로 간경변증으로 이행하며, 이 중 다수에서 간암이 병발하게 된다⁴⁾. 2000년 통계청 보고에 의하면 사망원인 중 간질환으로 인한 경우가 40대 남자에게서 1위, 50대 남자에게서 간질환과 간암이 1위와 2위를 차지하는 등 만성 간질환이 만연되어 있는 실정이다⁵⁾.

茵陳清肝湯加味方은 茵陳四苓散에 地榆, 靑皮, 蘿蔔子, 覆盆子 등을 가미한 茵陳清肝湯에 三稜, 蓬朮을 가미한 처방이다⁶⁾. 임상에서는 清熱利濕 消積祛瘀를 목표로 바이러스성 만성 간질환 특히 간경변증에 흔히 사용되고 있다.

茵陳清肝湯 및 茵陳清肝湯加味方에 대한 연구로는, 金⁷⁾이 급성 및 아급성·만성 경구독성시험에서 약물의 안전성을 보고하였고, 金⁸⁾은 전격성간염을 일으킨 마우스의 생존율 증가를, 禹⁹⁾는 만성B형간염 환자의 간기능 개선과 HBeAg의 음전율에 대한 임상보고를, 姜¹⁰⁾은 수침스트레스에 의한 간경변증에 간손상 회복과 진행 억제에 보고하였다. 또한 분자생물학적인 연구를 통해 茵陳清肝湯加味方이 유전자 조절을 통해 세포사멸을 억제한다고 보고하였다^{11,12)}. 최근에는 茵陳의 butanol fraction에서 세포사멸 관련 유전자를 조절하여 간세포 보호효과를 관찰하였고^{13,15)}, 茵陳이 섬유화 유발 유전자의 발현을 억제한다고 보고하였다¹⁶⁾.

본 실험에서는 茵陳清肝湯加味方의 간 섬유화 억제효과를 三稜·蓬朮 투여군 및 丹蔘 투여군과 비교 실험하였다. 三稜은 破血中之氣 散血瘀氣結 消腫止痛하고^{17,19)}, 蓬朮은 主一切氣 能通肝經聚血 行氣消瘀 通經化食止痛의 效能이 있어^{17,19)}, 간염이 진행하여 간조직의 섬유화와 재생결절이 생기는 간경변증에 유효한 것으로 판단하여 임상에서 많이 활용되고 있다. 또한 丹蔘은 중국에서 만성간염의 개선과 간경변증

의 진행 억제에 효과가 있다고 보고하고 있다^{20,22)}.

茵陳清肝湯加味方과 관련된 최근의 연구들은 대부분 세포배양을 이용한 실험에 의한 것으로서 간섬유화에 대한 생체내에서의 조직변화에 대한 연구가 미미한 실정이다.

이에 저자는 CCl₄를 이용하여 급성 및 아급성 간 섬유화 실험모델을 구축한 후 茵陳清肝湯加味方과 三稜·蓬朮 투여군 및 丹蔘 투여군이 간조직의 섬유화 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot, quantitative RT-PCR, 간의 육안적 검사 및 특수 조직검사들(Hematoxylin & Eosin stain, Reticulin stain, Masson-Trichrome stain)을 이용한 병리조직학적인 비교 관찰을 실시하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료 및 동물

1) 재료

본 실험에 사용한 약재는 慶熙韓方處方集¹⁹⁾ 및 韓藥規格集²³⁾에 근거하여 경희대 부속 한방병원에서 엄선 구입한 것을 사용하였으며 내용 및 용량은 다음과 같다.

2) 동물

혈청검사로 부터 마우스간염바이러스(mouse hepatitis virus) 감염이 인정되지 않고, 일반증상과 체중감소가 없는 체중 18~21g의 4주령 ICR계 마우스 암컷(삼육실험동물연구소)을 실험에 사용하였다. 마우스는 멸균한 polycarbonate cage에 방사선 멸균한 시판 마우스용 고형사료(대한실험동물센터)와 정제한 물을 자유 공급하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

(1) 약제의 추출 : 茵陳清肝湯加味方, 三稜·蓬朮, 丹蔘을 각각 171g씩을 환류추출기(Duksan, Korea)에 넣고, 냉각기를 부착한 상태에서 증류수를 각각 2000ml를 가하여 2시간씩 가열 추출하였다. 추출액

을 filter paper로 여과 후, Rotary evaporator(EYELA, Japan)로 감압 농축하여 농축액을 얻었다.

(2) 동결건조 : 이 농축액을 동결건조기(EYELA, Japan)로 건조하였다. 추출한 약물들의 동결건조를 통한 結果는 아래와 같다.

① 茵陳清肝湯加味方 : 35.6g (수율 : 20.82%)

② 三稜·蓬朮 : 24.6g (수율 : 14.39%)

③ 丹蔘 : 100.2g (수율 : 58.60%)

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

2) 실험설계

(1) 급성유발군

마우스는 ① 정상군(N), ② CCl₄투여군(C), ③ CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군(C-IC), ④ CCl₄+三稜·蓬朮 투여군(C-SB), ⑤ CCl₄+丹蔘 투여군(C-D)의 5군으로 나누고 군 당 10마리씩 배치하였다. Carbon tetrachloride는 oil과 1:4로 희석하여 0.1ml씩 매일 1회씩 10일간 복강주사 하였다. 각 검액은 마우스 당 10mg씩 10일간 매일 1회씩 경구투여 하였다. 또한 CCl₄투여군에는 증류수를 동량으로 10일간 매일 경구투여 하였다.

(2) 아급성유발군

마우스는 ① 정상군(N), ② CCl₄투여군(C), ③ CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군(C-IC), ④ CCl₄+三稜·蓬朮 투여군(C-SB), ⑤ CCl₄+丹蔘 투여군(C-D)의 5군으로 나누고 군 당 10마리씩 배치하였다. Carbon

tetrachloride를 oil과 1:4로 희석하여 0.1ml씩 매일 1회씩 10일간 복강주사하여 간조직의 섬유화를 유발한 후 각 검액을 마우스 당 10mg씩 20일간 매일 1회씩 경구투여 하였다. CCl₄투여군에는 섬유화 유발 후 증류수를 매일 1회씩 동량으로 20일간 연속 경구투여 하였다.

3) Western blotting for collagen type IV

간조직을 적출한 후 Dounce homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄된 간조직을 cell lysis buffer(NaCl 0.15M, Tris 10mM(Ph 7.4), EDTA 5mM, Triton X-100 1%, Phenylmethylsulfonyl fluoride 1mM, Aprotinin 0.23unit/ml, Leupeptin 10μM, Benzamidine 1mM)에 녹인 후 5분간 95℃에서 10분간 끓여 -70℃에 보관하였다. 전기영동은 12% SDS-PAGE에 각 lane당 50 μg의 단백질을 loading한 후 40v로 6시간 전기영동한 후 nylon membrane에 transfer하였다. Primary antibody는 rabbit anti-mouse type IV collagen (Research Diagnostics Inc.)을 사용하였고 secondary antibody는 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody를 사용하였으며 ECL detection system (Amersham- Pharmacia)을 이용하여 detection하였다. 정량화를 위해서 densitometer(Bio- Rad)를 이용하여 상대적인 비교를 시행하였다.

4) Quantitative RT-PCR

각 약물이 처리된 세포를 회수하여 Solution

(1) 丹蔘²³⁾

藥物	學名	生藥名	用量(g)
丹蔘	<i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i>	<i>Salviae Radix</i>	171
Total amount			171

(2) 三稜·蓬朮²³⁾

藥物	學名	生藥名	用量(g)
三稜	<i>Scirpus maritimus Linne</i>	<i>Scirpi Tuber</i>	85.5
蓬朮	<i>Curcuma zedoaria Roscoe</i>	<i>Zedoariae Rhizoma</i>	85.5
Total amount			171

(3) 茵陳清肝湯加味方⁶⁾

Prescription of Injinchungantang-Derivative			
構成藥物	學名	生藥名	用量(g)
茵陳	<i>Artemisia capillaris</i> Thunberg	<i>Artemisiae Capillaris</i> Herba	50
地榆(炒黑)	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	<i>Sanguisorbae</i> Radix	15
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	<i>Atractylodis Macrocephalae</i> Rhizoma	12
豬苓	<i>Polyporus umbellatus</i> Fies	<i>Ployporus</i>	12
白茯苓	<i>Poria cocos</i> Wolff	<i>Hoelen</i>	12
覆盆子	<i>Rubus coreanus</i> Miquel	<i>Rubi Fructus</i>	12
澤瀉	<i>Alisma plantago</i> Linne var. <i>parviflorum</i> Torr	<i>Alismatis Rhizoma</i>	8
蘿蔔子	<i>Raphanus sativus</i> L.	<i>Raphani Semen</i>	8
青皮	<i>Citrus nobilis</i> Makino	<i>Aurantii Pericarpium</i>	6
三稜	<i>Scirpus maritimus</i> Linne	<i>Scirpi Tuber</i>	6
蓬朮	<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	<i>Zeloariae Rhizoma</i>	6
砂仁	<i>Amomum xanthoides</i> Wallich	<i>Amomi Semen</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	12
Total amount			171

D(250g guanidine isothio-cyanate in 293ml water, 0.75 M sodium citrate 17.6ml, 10% sarkosyl 26.4ml, 0.1M 2-mercaptoethanol) 200 μ l, water-saturated phenol 200 μ l, chloroform- isoamyl alcohol(49:1) 40 μ l를 넣은 후 20분간 얼음에 보관한 후 12,000 x g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 회수하여 동량의 isopropanol을 넣은 후 -20℃에서 12시간 보관하였다. 다음 날 다시 12,000 x g에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 200 μ l의 ethanol을 넣어 RNA를 세척하였다. 세척한 RNA를 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. 5x reverse transcription buffer(Gibco BRL. MD)4 μ l, 25mM MgCl₂, 10mM dNTP mixture 2 μ l, RNase inhibitor (Promega, WI) 0.5 μ l, AMV Reverse transcriptase (8U/ μ l)(Gibco BRL.MD) 2 μ l, Oligo-dT(0.5 μ g/ μ l) 1 μ l, RNA 1 μ g (1 μ g/ μ l), H₂O 5.5 μ l의 시료를 혼합한 후 42℃에서 30분간 반응시켜 cDNA를 제작하였다. RNA의 정량화는 GAPDH를 이용하였으며 collagen type IV의 primer는 sense (5,-atgtcaccactgccaggacc-3,), anti-sense (5,-tctccaggcaaacaggtaa-3,)를 사용하였다. Primers(10 pmol)는 각각 10 μ l, dNTP 6 μ l, cCNA 2 μ l, Taq polymerase 0.5 μ l를 넣은 후 물을 100 μ l가 되도록 넣었다. PCR조건에서 첫 번째 denaturation은 95℃에서 5분간 시행하

고, 94℃ 30초, 56℃ 45초, 72℃ 1분에서 38 cycle을 시행하였으며, 마지막 cycle은 72℃에서 10분간 방치하였다.

5) 간장의 육안적 조건

마우스 간장을 적출하여 간장의 표면과 절단면을 육안으로 관찰하였다.

6) 병리조직학적 검사

(1) Hematoxylin & Eosin(H-E) 염색

마우스를 에테르 마취 하에, 채혈 후 방혈치사시킨 다음 간장을 적출하여 10% 중성포르말린 용액에 고정 한 후 파라핀포매기(Leica EG116)에 포매하여 로타리 마이크로톰(Leica)으로 4 μ m 두께로 조직절편을 제작한 다음 Hematoxylin & Eosin(H-E)염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) Reticulin 염색

마우스를 에테르 마취 하에, 채혈 후 방혈치사시킨 다음 간장을 적출하여 10% MBF액에 고정 한 후 파라핀포매기(Leica EG116)에 포매하여 로타리 마이크로톰(Leica)으로 4 μ m 두께로 절편한 다음 암모니아은액 및 0.2%염화금을 사용하여 염색하였다.

(3) Masson-Trichrome 염색

마우스를 에테르 마취 하에, 채혈 후 방혈치사시킨 다음 간장을 적출하여 Bouin액으로 고정한 후 파라핀포매기(Leica EG116)에 포매하여 로타리 마이크로톰(Leica)으로 4 μ m 두께로 절편한 다음 Weigert iron hematoxylin액, Biebrich scarlet -Acid fuchsin액, Phosphomolybdic-Phosphotungstic acid액, Aniline blue 액 등을 사용하여 염색하였다.

7) 통계학적 분석

CCl₄투여군과 각 약물투여군과의 비교에는 SPSS(8.0)의 Mann-Whitney Test를 이용하였으며, P-value<0.05인 경우를 유의성이 있는 경우로 보았다.

성 적

1. Western blotting for collagen type IV 결과

1) 급성유발군

급성 간섬유화를 유발한 마우스의 간조직에서 collagen type IV에 대한 western blot 검사 및 densitometer를 이용하여 정량화한 결과, 정상군의 collagen type IV는 126이었으며 CCl₄투여군에서는 204로 발현이 증가되었다. CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 발현정도가 각각 137, 158, 161로서 정상군 보다는 collagen type IV의 발현이 증가되었으나 CCl₄ 투여군 보다는 발현이 감소되었다(Table 1).

2) 아급성유발군

10일간의 CCl₄ 투여로 급성 간섬유화를 유발한 후 각각의 검액을 투여한 20일째 collagen type IV에 대한 western blot 검사 및 densitometer를 이용하여 정량화한 결과, 정상군에서 collagen type IV는 348이었고, CCl₄투여군에서는 753으로 크게 증가하였으나, CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서 각각 311, 326, 302로 CCl₄투여군보다 collagen type IV의 발현이 현저히 감소하였다(Table 2).

2. Quantitative RT-PCR 결과

1) 급성유발군

급성 간섬유화를 유발한 마우스 간조직에서 quantitative RT-PCR 방법으로 collagen type IV 및 GAPDH를 측정하였다. collagen type IV 유전자의 발현정도를 GAPDH 발현정도로 나눈 수치가 정상군은 0.55, CCl₄투여군은 0.56이었고, CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군의 경우 0.48로서 collagen type IV의 유전자 발현이 CCl₄투여군에 비해 감소된 경향을 보이거나 다른 약물군들은 각각 0.52, 0.55로 나타나 collagen type IV 유전자의 발현에는 큰 변화가 없었다(Table 3). 그러나, collagen type IV의 발현 조절은 transcription 과정 뿐만 아니라 post-transcription 과정을 통해서도 조절되기 때문에 본 결과만 가지고 투여한 약물이 collagen type IV의 발현에 영향을 미치지 않았다고 판단할 수는 없다.

Table 1. Quantification of Collagen Type IV in Acute Hepatic Fibrosis (Densitometer)

Group	N	C-SB	C-D	C-IC	C
Optic density	126	137	158	161	204

Values represent optic density of each group

N: Normal group, C-SB: CCl₄+Sammung·Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group, C: CCl₄ group

Table 2. Quantification of Collagen Type IV in Sub-Acute Hepatic Fibrosis (Densitometer)

Group	N	C-SB	C-D	C-IC	C
Optic density	348	311	326	302	753

Values represent optic density of each group

N: Normal group, C-SB: CCl₄+Sammung·Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group, C: CCl₄ group

2) 아급성유발군

아급성 간섬유화를 유발한 마우스 간조직에서 quantitative RT-PCR 방법으로 collagen type IV 및 GAPDH를 측정하였다. collagen type IV 유전자의 발현정도를 GAPDH 발현정도로 나눈 수치가 정상군은 1.88, CCl₄투여군은 1.63이었고, CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 각각 1.26, 0.97, 1.34로 나타나 CCl₄투여군에 비해 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군 모두에서 collagen type IV의 발현이 현저하게 억제되었음을 관찰하였다(Table 4).

3. 간장의 육안적 소견 결과

1) 급성유발군

CCl₄를 10일간 투여하여 급성 간섬유화가 유발된 마우스의 간장을 육안으로 관찰하였다. 정상군은 진한 담적색으로 간 표면 및 절단면에서 특이한 병변을 찾아볼 수 없었다. 간을 만져보았을 때의 탄력도도 정상이었다. CCl₄투여군의 마우스 간은 유백색으로 위축되었고 간표면은 섬유화가 진행되어 있었다. 절단면에는 간장조직의 피사부위로 생각되는 흰색

결절성 병변이 관찰되었다. 간을 만져보았을 때의 탄력도도 감소되어 있었다. CCl₄+三稜·蓬朮 투여군의 육안적 간 소견은 유백색 및 위축이 보였고 간의 표면은 섬유화 및 피사의 소견으로 보이는 흰색 병변이 관찰되었고 간의 탄력도가 감소되었으나 전반적으로 CCl₄투여군에 비해 그 정도가 약하였다. CCl₄+丹蔘 투여군의 육안적 간 소견은 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에 비해 유백색 및 간의 위축이 덜하고 섬유화의 정도도 경미하였다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군의 육안적 간 소견은 유백색의 간 표면이 거의 보이지 않았고 위축도 미미하며 섬유화가 거의 관찰되지 않았다. 간을 만져보았을 때 약간의 탄력도 감소가 있다고 판단되었다. 이상에서 급성간섬유화유발군에서 마우스 간장을 육안으로 관찰하여 색, 위축, 결절성 병변 및 탄력도 등을 살펴본 결과, CCl₄투여군에 비해 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에서는 경도의, CCl₄+丹蔘 투여군은 중등도의, CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 현저한 섬유화 억제효과가 있는 것으로 판단되었다(Table 5).

2) 아급성유발군

10일간의 CCl₄ 투여로 급성 간섬유화를 유발 후 각

Table 3. Quantitative RT-PCR of Collagen Type IV in Acute Hepatic Fibrosis

Group	N	C	C-SB	C-D	C-IC
Collagen type IV	134*	143	129	138	130
GAPDH	242	256	248	250	266
Collagen/GAPDH	0.55**	0.56	0.52	0.55	0.48

* : Values represent optic density of each group

** : Values represent the ratio of optic densities (collagen type IV/GAPDH) in each group

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+*Sammung*·*Bongchul* group, C-D: CCl₄+*Dansam* group, C-IC: CCl₄+*Injinchunggantang*-Derivative group

Table 4. Quantitative RT-PCR of Collagen Type IV in Sub-Acute Hepatic Fibrosis

Group	N	C	C-SB	C-D	C-IC
Collagen type IV	346*	320	288	230	328
GAPDH	184	196	228	236	244
Collagen/GAPDH	1.88**	1.63	1.26	0.97	1.34

* : Values represent optic density of each group

** : Values represent the ratio of optic densities (collagen type IV/GAPDH) in each group

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+*Sammung*·*Bongchul* group, C-D: CCl₄+*Dansam* group, C-IC: CCl₄+*Injinchunggantang*-Derivative group

Table 5. Macroscopic Findings of Liver in the Stage of Acute Hepatic Fibrosis

Group	N	C	C-SB	C-D	C-IC
Color	淡赤色	乳白色	乳白色 淡赤色	乳白色	淡赤色
Atrophy	-	+++	++	+	+/-
Elasticity	+++++	+	+++	+++	++++
Nodule	-	+++	++	++	+/-

Extent of acute hepatic fibrosis (-~/+/-~++++)

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+Sammung · Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group

Table 6. Macroscopic Findings of Liver in the Stage of Sub-Acute Hepatic Fibrosis

Group	N	C	C-SB	C-D	C-IC
Color	淡赤色	乳白色	乳白色 淡赤色	乳白色 淡赤色	淡赤色
Atrophy	-	++	+	+	+/-
Elasticity	+++++	++	+++	+++	++++
Nodule	-	++	+	+	+/-

Extent of sub-acute hepatic fibrosis (-~/+/-~++++)

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+Sammung · Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group

각의 검액을 투여한 20일 쯤에 마우스 간장을 육안으로 관찰하였다.

정상군은 진한 담적색을 띠고 있었으며 간 표면이나 절단면에서 특이한 병변이 발견되지 않았다. 간을 만져보았을 때의 탄력도도 정상이었다. CCl₄투여군의 마우스 간은 유백색을 띠었고 중등도로 위축되었고 간표면은 약간의 섬유화가 진행되어 있었다. 절단면에서는 간장조직의 괴사부위로 생각되는 흰색 결절성 병변이 중등도로 관찰되었다. 간을 만져보았을 때의 탄력도도 감소되어 있었다. CCl₄+三稜·蓬朮투여군에서는 유백색과 담적색을 띠었고 약간의 간 위축이 관찰되었다. 간의 표면은 섬유화 및 괴사의 소견으로 보이는 흰색 결절성 병변이 관찰되었고 간을 만져보았을 때 정도의 탄력도 감소가 있었으나, 전반적으로 그 정도가 CCl₄투여군에 비해 덜하였다. CCl₄+丹蔘투여군의 육안적 간 소견은 CCl₄+三稜·蓬朮투여군과 간 표면의 색, 위축, 탄력도 및 결절성 병변 등의 면에서 비슷한 정도로 관찰되었다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方투여군에서는 유백색의 간 표면이 거의 보이지 않았고 위축도 미미하였으며, 섬유화도 거의 관찰되지 않았다. 간을 만져 보았을 때 미미한 정도의 탄력도 감소가 있었다.

이상에서 아급성간섬유화유발군에서 마우스 간장을 육안으로 관찰하여 색, 위축, 결절성 병변 및 탄력도 등을 살펴본 결과, CCl₄투여군에 비하여 CCl₄+三稜·蓬朮투여군 및 CCl₄+丹蔘투여군에서는 중등도의 간섬유화 억제효과가, CCl₄+茵陳清肝湯加味方투여군에서는 현저한 간섬유화 억제효과가 있는 것으로 관찰되었다(Table 6).

4. 간장의 병리조직학적 소견 결과

1) 급성유발군

급성 간섬유화를 유발한 마우스에 대하여 Hematoxylin & Eosin, Reticulin 및 Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였다.

정상군에서는 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었고, 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포 괴사나 염증반응은 관찰되지 않았다(H-E 염색)(Fig. 1). 세망조직은 섬세하게 잘 유지되었으며(Reticulin 염색)(Fig. 2), collagen은 관찰되지 않았다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 3).

CCl₄투여군에서는 간소엽의 입체구조가 소실되었고 문맥 주위와 중심정맥 주위로 심한 정도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 심한 간세포

괴사와 이에 동반된 염증반응도 관찰되었다(H-E 염색)(Fig. 4). 세망조직은 심한 파괴 및 압축소견을 보였고(Reticulin 염색)(Fig. 5), 문맥 주위 및 중심정맥 주위로 비교적 많은 collagen이 관찰되었다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 6).

CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 어느 정도 소실되었고 문맥 주위로 약간의 섬유화가 관찰되었으나, 중심정맥 주위 및 기타 간조직의 전반적 구조는 비교적 정상적인 것으로 관찰되었다. 간세포의 괴사 및 염증반응이 일부 관찰되었다(H-E 염색)(Fig. 7). 세망조직은 중등도의 파괴 및 압축소견을 보였으며(Reticulin 염색)(Fig. 8), 문맥 주위와 중심정맥 주위로 collagen이 관찰되었으나 CCl₄투여군에 비하여 덜 한 것으로 판단되었다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 9).

CCl₄+丹蔘 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 어느 정도 유지되었고 문맥주위에서 약간의 섬유화가 발생하였으며, 간세포 괴사 및 염증반응이 있었으나 그 정도가 CCl₄+三稜·蓬朮투여군에서 보다 덜 하였다(H-E 염색)(Fig. 10). 세망조직은 경도의 파괴 및 압축소견을 보였고(Reticulin 염색)(Fig. 11), 문맥 주위와 중심정맥 주위로 collagen이 경미하게 관찰되었다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 12).

CCl₄+茵蔯清肝湯加味方 투여군에서는 비교적 간소엽의 입체구조도 정상에 가까웠고 문맥주위역, 중심정맥부분 및 기타 간조직에서 미미한 정도의 섬유화가 관찰되었다(H-E 염색)(Fig. 13). 세망조직은 경도의 압축소견을 보였으나, 비교적 잘 유지되었으며

(Reticulin 염색)(Fig. 14), 문맥 주위와 중심정맥 주위로 collagen이 미미하게 관찰되었다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 15).

이상에서 급성간염유발유발군에서 마우스 간조직의 섬유화 억제효과를 관찰하기 위해 Hematoxylin & Eosin 염색, Reticulin 염색 및 Masson-Trichrome 염색을 통해 간소엽의 입체구조, 간세포 괴사 및 섬유화, 염증반응, 세망조직 및 collagen 발생정도 등의 관점에서 비교 관찰한 결과, CCl₄투여군에 비하여 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군과 CCl₄+丹蔘 투여군에서는 경도 및 중등도의 섬유화 억제효과가, CCl₄+茵蔯清肝湯加味方 투여군에서는 현저한 섬유화 억제효과가 있는 것으로 관찰되었다(Table 7).

2) 아급성유발군

아급성 간염유발을 유발한 마우스에 대하여 Hematoxylin & Eosin, Reticulin 및 Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였다.

정상군에서는 간소엽의 입체구조가 정상적이었으며, 문맥 주위와 중심정맥 주위에서 섬유화, 간세포의 괴사 및 염증소견은 관찰되지 않았다(H-E 염색)(Fig. 16). 세망조직은 정상적인 pattern을 유지하였고(Reticulin 염색)(Fig. 17), collagen은 관찰되지 않았다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 18).

CCl₄투여군에서는 간소엽의 입체구조가 일부 소실되었고 문맥주위와 중심정맥 주위로 경도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직은 경도의 간세포 괴사 및 이와 동반된 염증반응이 관찰되었다(H-E 염색)(Fig.

Table 7. Histological Findings of Liver in the Stage of Acute Hepatic Fibrosis

Group	N	C	C-SB	C-D	C-IC
Lobular architecture	well preserved	distorted	partially preserved	partially preserved	preserved
Cell necrosis and fibrosis	-	+++	++	+	+/-
Inflammation	-	+++	++	+	+/-
Reticulin	well	distorted and	less distorted and	less distorted and	slightly distorted
Collagen tissue system	- preserved	+++ condensed	++ condensed	+ condensed	+/- condensed and

Extent of acute hepatic fibrosis (-~+/-~+++)

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+Samnung · Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group

19). 세망조직은 경도의 파괴 및 압축소견을 보였고(Reticulin 염색)(Fig. 20), 문맥 주위 및 중심정맥 주위로 경도의 collagen이 관찰되었다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 21).

CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에서는 문맥 주위와 중심정맥 주위로 중등도의 collagen이 관찰되어(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 24), CCl₄투여군보다 진행된 것으로 판단되었다. 간소엽의 입체구조가 비교적 유지되었고 문맥 주위로 약간의 섬유화가 관찰되었으나 중심정맥주위 및 기타 간조직의 전반적 구조는 비교적 정상적이었으며, 간세포의 괴사나 염증반응이 일부 관찰되었다(H-E 염색)(Fig. 22). 세망조직은 경미한 정도의 파괴 및 압축소견을 보였다(Reticulin 염색)(Fig. 23). 전반적으로 CCl₄투여군에 비해 그 정도가 덜 한 것으로 판단되었다.

CCl₄+丹蔘 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 비교적 유지되었고 문맥 주위에서 약간의 섬유화가 발생되었으며, 간세포 괴사 및 염증반응이 일부 관찰되었다(H-E 염색)(Fig. 25). 세망조직은 경도의 파괴 및 압축소견을 보였고(Reticulin 염색)(Fig. 26), collagen의 발생 정도는 CCl₄투여군과 비슷한 정도로 관찰되었다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 27).

CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 비교적 간소엽의 입체구조도 정상에 가깝고 문맥주위역, 중심정맥부분 및 기타 간조직에서 미미한 정도의 섬유화가 관찰되었다(H-E 염색)(Fig. 28). 세망조직은 거의 정상적인 구조를 유지했으며(Reticulin 염색)(Fig. 29), 미미한 정도의 collagen이 관찰되었다(Masson-

Trichrome 염색)(Fig. 30).

이상에서 아급성간섬유화유발군에서 마우스 간조직의 섬유화 억제효과를 관찰하기 위해 Hematoxylin & Eosin 염색, Reticulin 염색 및 Masson-Trichrome 염색을 통해 간소엽의 입체구조, 간세포 괴사 및 섬유화, 염증반응, 세망조직 및 collagen 발생정도 등의 관점에서 비교 관찰한 결과, CCl₄투여군에 비하여 CCl₄+三稜·蓬朮투여군 및 CCl₄+丹蔘투여군에서는 경도의 섬유화 억제효과가, CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 현저한 섬유화 억제효과가 있는 것으로 판단되었다(Table 8).

5. 통계학적 분석 결과

상기 조직검사상의 형태학적 변화의 결과에서 정상적인 간조직 상태를 score 0으로 하고, 가장 심하게 섬유화된 상태를 score V로하여 점수화하여 급성 및 아급성간섬유화유발군에서 각각 약물투여군의 점수를 CCl₄투여군과 비교하여 Mann-Whitney Test를 이용하여 통계 분석하였다.

급성섬유화유발군에서는 CCl₄투여군에 비해 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군 및 CCl₄+丹蔘 투여군은 통계학적으로 의미있는 결과가 나타나지 않았다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 마우스 간조직의 섬유화 억제효과가 유의한 것으로 나타났다(P<0.05) (Table 9).

아급성간섬유화유발군에서는 CCl₄투여군에 비해 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군이 모두 현저하게 마

Table 8. Histological Findings of Liver in the Stage of Sub-Acute Hepatic Fibrosis

N	C	C-SB	C-D	C-IC	
lobular architecture	well preserved	partiallydistorted	partially preserved	partially preserved	preserved
Cell necrosis and fibrosis	-	++	+	+	+/-
Inflammation	-	++	+	+	+/-
Reticulin system	well preserved	distorted and condensated	slightly distorted and condensate	slightly distorted and dcondensated	preserved
Collagen tissue	-	+	++	+	+/-

Extent of Sub-acute Hepatic Fibrosis (-~/+/-~++)

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+Sannung · Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group

Table 9. Scoring of Histological Findings of Acute Hepatic Fibrosis

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean
N	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0a)	0.1#
C	3.8	4.2	2	3.6	2.8	4.6	3.4	2.2	4.2	3	3.38
C-SB	2.3	3.2	2.8	2.4	2.6	3.6	3.2	3.6	3.2	2.2	2.91
C-D	2.6	3.4	2.2	3.2	2.4	2.8	3	2.5	2	3.2	2.73
C-IC	1.6	2.2	2.6	2.8	2.4	2.2	2.4	2.8	3.2	2.2	2.44*

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+Sammung · Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group

a) : Score of histological finding of each slide in the extent of acute hepatic fibrosis

: Mean value of each score of histological finding of each slide in the extent of acute hepatic fibrosis

* : Statistically significant compared with CCl₄ only data(P<0.05).

Table 10. Scoring of Histological Findings of Sub-Acute Hepatic Fibrosis

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1a)	0.1#
C	2.5	2.8	1.8	2.4	2.6	3.2	2.6	2.0	2.8	2.6	2.53**
C-SB	1.4	1.2	1.4	1.7	1.9	1.1	1.0	2.2	2.0	1.4	1.53**
C-D	1.3	1.4	1.0	1.6	1.8	1.6	1.2	1.4	1.6	1.2	1.41**
C-IC	0.6	0.4	0.4	0.8	0.8	1.2	0.4	0.2	0.3	0.4	0.55**

N: Normal group, C: CCl₄ group, C-SB: CCl₄+Sammung · Bongchul group, C-D: CCl₄+Dansam group, C-IC: CCl₄+Injinchunggantang-Derivative group

a) : Score of histological finding of each slide in the extent of sub-acute hepatic fibrosis

: Mean value of scores of histological finding of each slide in the extent of sub-acute hepatic fibrosis

** : Statistically significant compared with CCl₄ only data(P<0.01).

우스 간조직의 섬유화 억제효과가 있는 것으로 나타났다(P<0.01)(Table 10).

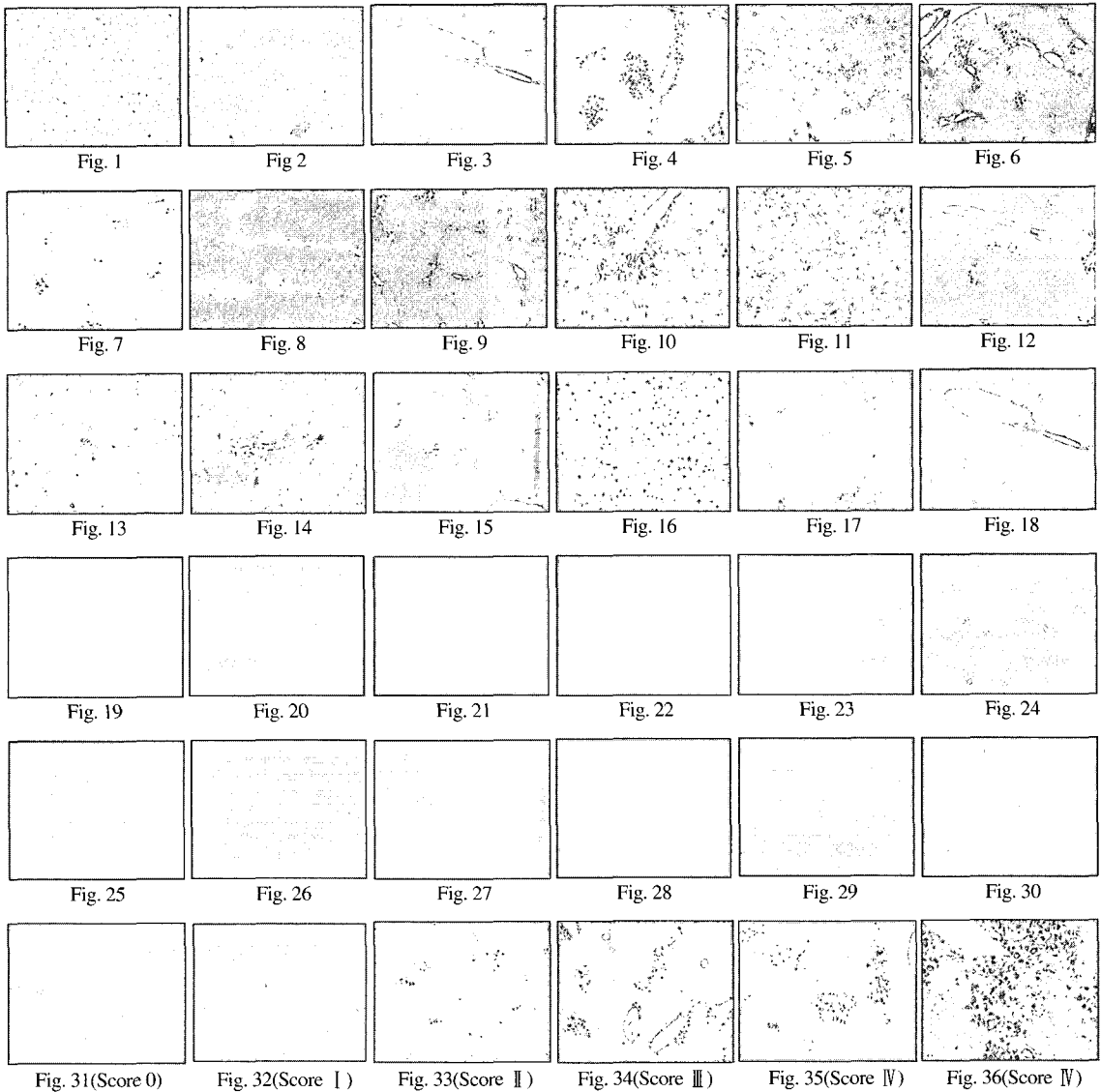
이상의 결과로 볼 때, 임상에서 三稜 · 蓬朮과 丹蔘은 간조직의 섬유화 진행기간이 비교적 중장기적인 경우에 섬유화 억제효과가 있을 것으로 판단되었고, 茵蔯清肝湯加味方은 간조직의 섬유화 진행기간이 급성적이든 중장기적이든 섬유화가 유발된 모든 경우에서 진행 억제효과가 있을 것으로 판단되었으며 특히, 섬유화 유발기간이 길수록 현저한 효과가 있는 것으로 보아 임상에서 바이러스성 만성간염에서 진행한 간경변증의 치료에 유효하게 활용할 수 있다고 사료된다.

고 찰

우리 나라에서 만성 간질환은 주요 사망 원인 중의 하나이며 진행함에 따라 간경변증의 합병증이나

간암으로 사망하게 된다²⁴⁾. 만성간염 환자들의 약 70%가 혈청 HBsAg이 양성이고, HBsAg이 음성인 경우에서도 약 75%가 C형간염이므로 바이러스성 간질환이 만성 간질환의 대부분을 차지한다²⁵⁻²⁷⁾. B형이나 C형 바이러스에 의한 만성간염의 경우 문맥 주위부의 조각괴사가 가장 대표적인 조직학적 소견이다. 괴사성 염증이 문맥 주위부 간세포의 한계판을 파괴시킨 후 간실질로 염증성 괴사가 파급되어 문맥부가 확장되고 염증성 병변으로 문맥부와 문맥부가 연결된다. 이와 같은 괴사성 염증은 간섬유화를 동반하게 되며 결국 간경변증으로 진행한다²⁸⁻³⁰⁾.

한의학 문헌에 나타난 증후 중 간질환의 범주에 속한 것으로는 黃疸, 脹滿(鼓脹), 積聚, 脇痛, 酒傷 등이 있다. 그 중 황달은 바이러스성 간염 및 간경변증의 경과 관찰이나 치료에 중심이 되는 증후이다. 「黃帝內經」의 '素問 平人氣象論'³¹⁾에서 "尿黃赤 安臥者 黃疸"이라 하였고, '靈樞 論疾診尺篇'³²⁾에서는 "身痛



Legends for Figures

Microscopic findings

1) Acute injury

Normal group - Well preserved lobular architecture without liver cell damage or fibrosis. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome staining(Fig. 1-3). x200.

CCl₄ group - Markedly distorted lobular architecture with large confluent hepatic necrosis and fibrosis. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 4-6). x200.

CCl₄+*Sammung · Bongchul* group - Distorted lobular architecture with focal hepatic necrosis and fibrosis. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 7-9). x200

CCl₄+*Dansam* group - Less distorted lobular architecture with focal hepatic necrosis and fibrosis compared to CCl₄+*Sammung · Bongchul* group. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 10-12). x200

CCl₄+*Injinchungantang*-derivative group - Slightly distorted lobular architecture with focal degenerating hepatocytes. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 13-15). x200.

2) Subacute injury

Normal group - Well preserved lobular architecture without liver cell damage or fibrosis. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 16-18). x200.

CCl₄ group - Distorted lobular architecture with focal hepatic necrosis and fibrosis. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 19-21). x100.

CCl₄+*Samnung* · *Bongchul* group - Focal hepatic necrosis and slight fibrosis with degenerating hepatocytes. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 22-24). x100.

CCl₄+*Dansam* group - Focal hepatic necrosis and slight fibrosis with degenerating hepatocytes. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 25-27). x100.

CCl₄+*Injinchunggantang*-derivative group - rather well preserved hepatic lobular architecture without significant hepatocytic necrosis. Hematoxylin and Eosin, Reticulin, Masson-Trichrome stain(Fig. 28-30). x100.

而色微黃 黃疸也 安臥 小便黃赤 脈小而澁 不嗜食”이라 하였는데, 이는 급·만성 간질환에서 나타날 수 있는 증후이다.

본 실험에 쓰인 茵陳淸肝湯加味方⁹⁾은 張³³⁾이 濕熱黃疸의 치료에 사용한 茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고 地榆(炒黑), 蘿蔔子, 覆盆子, 靑皮, 砂仁을 가미한 茵陳淸肝湯에 다시 三稜, 蓬朮을 가한 처방이다. 임상에서는 淸熱利濕, 消積祛瘀를 목표로 바이러스성 간경변증의 치료에 사용되고 있다.

茵陳淸肝湯과 茵陳淸肝湯加味方에 대한 연구로는, 金³⁴⁾이 茵陳淸肝湯이 전격성간염을 일으킨 마우스의 생존율을 53%로 높이는 효과가 있다고 보고하였고, 禹³⁵⁾가 만성B형간염 환자에 대한 임상 보고에서 혈청학적 검사상 AST, ALT 등의 간기능 개선과 HBeAg의 음전에 대한 효과가 있다고 보고하였다. 또한 金³⁶⁾은 茵陳淸肝湯의 안전성에 관한 연구에서 급성 및 아급성·만성 경구독성 및 부작용을 나타내지 않았다고 보고하였다. 姜³⁷⁾은 茵陳淸肝湯加味方이 MHV-2 및 수침스트레스로 실험적 간경변증을 유발한 마우스에 대하여 간기능 개선, 간보호, 간손상 회복, 간세포 재생에 유의한 효과가 있어 만성간염이 간경변증으로 이행되는 것을 억제한다고 보고하였다.

최근에는 분자생물학적인 접근을 통해 한약의 효능을 검증하는 보고가 많은데, 朴³⁸⁾은 茵陳淸肝湯加味方이 Bcl-2, Bcl-XL 활성을 높여 세포사멸을 억제한다고 보고하였고, 洪³⁹⁾과 高⁴⁰⁾는 茵陳淸肝湯加味方과 茵陳四苓散 분획물이 간세포를 보호하고 Cpp32 protease, Fas를 억제하고, Bcl-2를 활성화시켜 세포사

멸을 억제한다고 보고하였다. 李⁴¹⁾는 茵陳의 분획물 중 butanol fraction에서 Fas를 매개로 하는 세포사멸에 대해 간세포 보호효과가 가장 높다고 보고하였으며, 李⁴²⁾는 茵陳의 butanol fraction은 간세포의 TGF-β1 유도성 세포사멸에 관여하는 유전자를 조절함으로써 세포손상을 억제하여 간기능을 보호하는 효과가 있음을 보고하였다. 辛⁴³⁾은 茵陳이 TGF-β1 유도성 간섬유화에 미치는 영향을 연구하여 인진은 TGF-β1 합성을 억제하였고 fibroblast의 세포증식과 섬유화유발 유전자의 발현을 억제하였음을 보고하였다.

三稜은 破血中之氣, 散一切血瘀氣結, 消腫止痛의 효능이 있고 간으로 귀경하며¹⁷⁻¹⁹⁾, 蓬朮은 主一切氣, 能通肝經聚血, 行氣消瘀, 通經化食止痛의 효능이 있고 역시 간으로 귀경한다¹⁷⁻¹⁹⁾. 따라서 三稜, 蓬朮은 간염이후 지속적인 간세포의 괴사, 섬유조직의 증식 및 재생결절이 생기는 간경변증에 효능이 있을 것으로 판단된다.

丹蔘은 최근 중국에서 만성간염 및 간경변증에 많이 이용하는 약물로, 만성B형간염에서 간기능개선, 치료에 효과가 있고 간경변증에서 증상 호전과 진행 억제 등에 유의한 효과가 있다고 보고하고 있다²⁰⁻²²⁾.

간섬유화는 만성 간질환에서 보이는 특징적인 병태생리학적 과정으로 특히 활동성 바이러스성 간염에서 활성화되어 정상적인 간의 구조를 변형시키고, 이에 따라 간기능의 저하 및 문맥압의 상승에 의한 합병증을 병발하며, 최종적으로는 간경변증을 유발하게 된다²⁸⁻³⁰⁾. 섬유화의 지표로 인식되는 교원질(collagen)은 섬유성단백질(fibrousprotein)로 인체의

거의 모든 조직에 분포한다. 현재까지 밝혀진 교원질 중 간조직에서의 분포와 양상이 비교적 잘 알려진 것은 제 1형, 3형, 4형 교원질이며, 특히 간섬유화 진행의 혈청학적 지표로서의 가능성이 주목된 것은 제 3형과 4형 교원질이다.

간섬유화와 함께 나타나는 동양구조의 연속적인 기저막 형성 즉 모세혈관화는 Shaffner 등³⁴⁾에 의해 처음 기술되었는데, 기저막의 주성분은 제 4형 교원질과 laminin이며, 간장과 골수의 동양혈관을 제외한 모든 혈관에 분포한다. Shaffner 등은 정상적인 간에서는 기저막이 혈관, 림프관 및 일부 신경섬유 주위에서만 존재하고 동양구조에서는 존재하지 않아 혈액과 간세포 사이의 물질교환이 자유로이 이루어지는 반면, 간경변증에서는 동양구조와 간세포 사이에 연속적인 기저막이 형성되면서 간세포와 혈액사이의 순환이 폐쇄되어 간기능 부전이 더욱 악화됨을 관찰하였다. 따라서, 이러한 모세혈관화를 이루는 주성분으로 밝혀진 제 4형 교원질의 간섬유화의 지표로서의 가능성이 연구되기 시작했다.

Matsumoto 등³⁵⁾은 동물실험을 통해 혈청 제 4형 교원질의 농도가 교원질의 합성을 반영하는 prolylhydroxylase의 활성도와 상관관계가 있음을 보고하였고, Hahn 등³⁶⁾과 Ueno 등³⁷⁾은 제 4형 교원질에 대한 간접면역형광법과 단일클론성항체를 이용한 효소면역측정법을 이용하여 간경변증의 조직 내에서 이들이 증가함을 보고하였다. 제 4형 교원질은 7S 영역과 7TH영역의 2개의 삼중고리 구조와 NC1과 NC2의 2개의 비교 원질성 영역(non collagenous domain)으로 이루어져 있으며, 이들 개개의 분자들은 서로 결합하여 그물구조를 이루고 있다³⁸⁾. Nakayama 등³⁹⁾은 제 4형 교원질의 7S 영역을 인지하는 방사선 면역측정법을 통해 다른 기준에 제시된 섬유화 지표들과 비교한 결과, 제 4형 교원질이 PCN-Ⅲ, laminin 보다 간섬유화 정도를 더 잘 반영하는 것으로 보고하였다.

인간에서는 간염 바이러스의 감염 후 간과사가 일어나고 간섬유화 과정을 거쳐 간경변으로 이행되는 데는 그 기간이 길기 때문에 동물모델이 필요하다.

사염화탄소의 단기 투여는 실험적인 간손상 및 간섬유화를 일으키는데 일반적으로 많이 사용되고 있다. CCl₄가 간손상 및 간섬유화를 일으키는 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않으나 CCl₄의 산화제로서의 역할이 중요시되고 있다. 이와 관련하여 CCl₄로 급성 간손상이 유발된 흰쥐에서 지질의 과산화(lipid peroxidation)를 나타내는 malon-aldehyde의 증가가 collagen α_1 (I) mRNA의 발현에 관계가 있다고 보고되고 있다⁴⁰⁾.

본 실험에서 급성간섬유화유발군에 대한 western blot 결과를 densitometer를 이용하여 정량화한 결과, 정상군의 collagen type IV는 126이었으며 CCl₄투여군에서는 204로 collagen type IV의 발현이 증가되었다. CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 발현정도가 각각 137, 158, 161로서 정상군보다는 collagen type IV의 발현이 증가되었으나 CCl₄투여군보다는 발현이 감소된 것을 확인하였다. 따라서 3종류 약물투여군 모두가 collagen type IV의 발현억제에 효과적이었다고 판단되었다.

아급성간섬유화유발군에서 collagen type IV에 대한 western blot 결과를 densitometer를 이용하여 정량화한 결과, 정상군에서 collagen type IV는 126이었고, CCl₄투여군에서는 753으로 크게 증가하였고, CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서 각각 311, 326, 302로 나타나 CCl₄투여군에 비해 3종류 약물투여군 모두에서 collagen type IV의 발현이 현저히 감소된 것을 관찰하였다.

본 실험에서는 간섬유화와 가장 상관관계가 높은 collagen type IV에 대한 quantitative RT-PCR을 실험하였다. 급성간섬유화유발군에 대한 실험결과 collagen type IV 유전자의 발현정도를 GAPDH 발현 정도로 나눈 수치가 정상군은 0.55, CCl₄투여군은 0.56, CCl₄+三稜·蓬朮 투여군은 0.52, CCl₄+丹蔘 투여군은 0.55, CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군은 0.48로서 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군과 CCl₄+丹蔘 투여군은 collagen type IV의 발현억제에 큰 영향을 미치지

못하는 것으로 나타났다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군의 경우 collagen type IV의 유전자 발현이 감소된 경향을 보여 일정한 정도의 섬유화 억제효과가 있는 것으로 판단되었다. 그러나 collagen type IV의 발현 조절은 transcription 과정 뿐만아니라 post-transcription 과정을 통해서도 조절되기 때문에 본 결과만 가지고 투여한 약물이 Collagen type IV의 발현에 영향을 미치지 않았다고 판단할 수는 없다.

아급성간염유화유발군에서 quantitative RT-PCR 방법으로 collagen type IV 및 GAPDH를 측정하였다. collagen type IV 유전자의 발현정도를 GAPDH 발현 정도로 나눈 수치가 정상군은 1.88, CCl₄투여군은 1.63이었고, CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 각각 1.26, 0.97, 1.34로 나타났다. 이상의 결과로서 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군 모두에서 CCl₄투여군에 비해 collagen type IV의 발현이 현저하게 억제되었음을 관찰하였다.

CCl₄ 투여 10일째 마우스 간장을 육안으로 관찰하였다. 정상군은 진한 담적색으로 간 표면 및 절단면에는 특이한 병변을 찾아볼 수 없었다. 간을 만져 보았을 때의 탄력도도 정상적이었다. CCl₄투여군의 마우스 간장은 유백색으로 위축되고 간 표면은 섬유화가 진행되어 있었다. 절단면에는 간장조직의 괴사부위로 생각되는 흰색 결절성 병변이 관찰되었다. 간을 만져 보았을 때의 탄력도도 상당히 감소되어 있었다. CCl₄+三稜·蓬朮 투여군의 육안적 간 소견은 유백색 및 위축이 보이고 간의 표면은 섬유화 및 괴사의 소견으로 보이는 흰색 병변이 관찰되었고, 간의 탄력도가 감소되었으나 CCl₄투여군에 비해 정도가 덜하였다. CCl₄+丹蔘 투여군의 육안적 간 소견은 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에 비해 유백색 및 간의 위축이 덜하였고 섬유화의 정도도 경미하였으며, 간의 탄력도는 비슷한 정도였다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군의 육안적 간 소견은 유백색의 간 표면이 거의 보이지 않고 위축도 미미하며 섬유화는 거의 관찰되지 않았다. 간을 만져 보았을 때 약간의 탄력도 감소가 있다

고 판단되었다.

이상에서 급성간염유화유발군의 마우스 간장을 육안적 관찰을 통해 간표면의 색, 위축, 결절성 병변 및 탄력도 등을 관찰한 결과, CCl₄투여군에 비해 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군은 경도의, CCl₄+丹蔘 투여군은 중등도의, CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군은 현저한 섬유화 억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

10일간의 CCl₄ 투여로 급성 간염유화를 유발한 후 각각의 검액 투여 20일 쯤 마우스 간장을 육안으로 관찰하였다. 정상군은 진한 담적색을 띠고 있었으며 간 표면 및 절단면에서 특이한 병변이 관찰되지 않았다. 간을 만져 보았을 때의 탄력도도 정상이었다. CCl₄투여군의 마우스의 간 표면은 유백색을 띠고 중등도로 위축되었고 약간의 섬유화가 진행되어 있었다. 절단면에서는 간조직의 괴사부위로 생각되는 흰색 결절성 병변이 중등도로 관찰되었다. 간을 만져 보았을 때의 탄력도도 감소되어 있었다. CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에서 간 표면은 유백색과 담적색을 띠고 약간의 위축이 보였고 절단면에서 섬유화 및 괴사의 소견으로 보이는 흰색 결절성 병변이 관찰되었고 간의 탄력도도 약간 감소되었으나 CCl₄투여군에 비해 정도가 약하였다. CCl₄+丹蔘투여군의 육안적 간 소견은 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군과 간 표면의 색, 위축, 탄력도 및 결절성 병변 등의 면에서 비슷한 정도로 관찰되었다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군의 육안적 간 소견은 유백색의 간 표면이 거의 보이지 않고 위축도 미미하며 섬유화는 거의 관찰되지 않았다. 간을 만져 보았을 때 미미한 정도의 탄력도 감소가 있다고 판단되었다.

이상에서 아급성간염유화유발군에서 육안으로 마우스 간장 표면의 색, 위축, 탄력도 및 결절성 병변 등의 면에서 관찰한 결과, CCl₄투여군에 비하여 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군과 CCl₄+丹蔘 투여군에서는 중등도의 간염유화 억제효과가, CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 현저한 간염유화 억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

간장의 병리조직학적 실험 중, 급성 간염유화를 유발한 마우스에 대하여 Hematoxylin & Eosin 염색,

Reticulin 염색 및 Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였다. 정상군에서는 간소엽의 입체구조가 정상적이었고 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포의 괴사나 염증반응의 소견은 관찰되지 않았다. 세망조직은 섬세한 상태로 잘 유지되었으며, collagen은 관찰되지 않았다. CCl₄투여군에서는 간소엽의 입체구조가 전반적으로 소실되었고 문맥 주위와 중심정맥 주위로 심한 정도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직 전반에 걸쳐 심한 간세포 괴사 및 염증반응이 관찰되었다. 세망조직은 심한 파괴 및 압축소견을 보였고, 문맥 주위 및 중심정맥 주위로 비교적 많은 collagen이 관찰되었다. CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 일부 소실되었고 문맥 주위로 약간의 섬유화가 관찰되었으나 중심정맥 주위 및 기타 간조직의 전반적인 구조는 비교적 정상적이었고 간세포의 괴사나 염증반응이 일부 관찰되었다. 세망조직은 중등도의 파괴 및 압축소견을 보였으며, 문맥 및 중심정맥 주위로 collagen이 관찰되었으나 CCl₄투여군에 비하여 덜 한 것으로 판단되었다. CCl₄+丹蔘 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 어느 정도 유지되었으며 문맥 주위에서 경도의 섬유화가 관찰되었고, 간세포 괴사 및 염증반응이 있었으나 그 정도가 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군보다 덜 하였다. 세망조직은 경도의 파괴 및 압축 소견을 보였고, collagen이 문맥 주위와 중심정맥 주위로 경미하게 관찰되었다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 간소엽의 입체구조도 정상에 가까웠고 문맥주위역, 중심정맥부분 및 기타 간조직에서 미미한 정도의 섬유화가 관찰되었다. 세망조직은 경도의 압축소견이 관찰되었으나 비교적 잘 유지되었으며, collagen이 미미한 정도로 관찰되었다. 이상에서 급성간섬유화 유발군에서 마우스 간조직의 섬유화 억제효과를 관찰하기 위해 Hematoxylin & Eosin 염색, Reticulin 염색 및 Masson-Trichrome 염색을 통해 간소엽의 입체구조, 간세포 괴사, 섬유화, 염증반응, 세망조직 및 collagen 발생정도 등의 관점에서 비교 관찰한 결과, CCl₄투여군에 비하여 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군과

CCl₄+丹蔘 투여군에서는 경도 및 중등도의 섬유화 억제효과가, CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 현저한 섬유화 억제효과가 있는 것으로 관찰되었다.

아급성 간섬유화를 유발한 마우스에 대하여 Hematoxylin & Eosin 염색, Reticulin 염색 및 Masson-Trichrome 염색으로 간조직을 관찰하였다. 정상군에서는 간소엽의 입체구조가 정상적이었으며 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포의 괴사나 염증반응의 소견은 관찰되지 않았다. 세망조직도 섬세하게 잘 유지되었으며, collagen은 관찰되지 않았다. CCl₄투여군에서는 간소엽의 입체구조가 일부 소실되었고 문맥 주위와 중심정맥 주위로 경도의 섬유화가 관찰되었다. 간조직은 경도의 간세포의 괴사 및 이와 동반된 염증반응이 관찰되었다. 세망조직은 경도의 파괴 및 압축소견을 보였고, 문맥 주위 및 중심정맥 주위로 약간의 collagen이 관찰되었다. CCl₄+三稜·蓬朮 투여군에서는 문맥 주위와 중심정맥 주위로 중등도의 collagen 조직이 관찰되어, CCl₄투여군보다 진행된 것으로 관찰되었으나 간소엽의 입체구조가 비교적 유지되었으며 문맥 주위로 약간의 섬유화가 관찰되었으나 중심정맥 주위 및 기타 간조직의 전반적 구조는 비교적 정상적이었고, 간세포의 괴사 및 염증반응은 일부 관찰되었다. 세망조직의 파괴 및 압축이 경미한 정도로 관찰되어, 전체적으로 CCl₄투여군에 비해 섬유화 억제경향이 있는 것으로 판단되었다. CCl₄+丹蔘 투여군에서는 간소엽의 입체구조가 어느 정도 유지되고 있었으며, 문맥 주위에서 약간의 섬유화가 관찰되었다. 간세포 괴사 및 염증반응이 일부 관찰되었다. 세망조직은 경도의 파괴 및 압축소견을 보였고, collagen 발생정도는 CCl₄투여군과 비슷한 정도로 관찰되었다. CCl₄+茵陳清肝湯加味方 투여군에서는 비교적 간소엽의 입체구조도 정상에 가까웠고 문맥 주위, 중심정맥 주위 및 기타 간조직에서 미미한 정도의 섬유화가 관찰되었다. 세망조직은 거의 정상적인 구조를 유지했으며, collagen은 미미한 정도로 관찰되었다.

이상에서 아급성간섬유화유발군에서 마우스 간조직의 섬유화 억제효과를 관찰하기 위해 Hematoxylin

& Eosin 염색, Reticulin 염색 및 Masson-Trichrome 염색을 통해 간소엽의 입체구조, 간세포 괴사, 섬유화, 염증반응, 세망조직 및 collagen 발생정도 등의 관점에서 비교 관찰한 결과, CCl₄투여군에 비하여 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군 및 CCl₄+丹蔘 투여군에서는 정도의 섬유화 억제효과가, CCl₄+茵蔯清肝湯加味方 투여군에서는 현저한 섬유화 억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

각 약물의 섬유화 억제효과를 점수화하여 Mann-Whitney Test로 통계 분석한 결과, 급성간섬유화유발군에서는 CCl₄투여군에 비해 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군 및 CCl₄+丹蔘 투여군은 통계학적으로 의미있는 결과가 나타나지 않았다. CCl₄+茵蔯清肝湯加味方 투여군에서는 CCl₄투여군에 비해 마우스 간조직의 섬유화 억제효과가 95% 신뢰도로 유의한 것으로 나타났다.

아급성간섬유화유발군에서는 CCl₄투여군에 비해 CCl₄+三稜·蓬朮 투여군, CCl₄+丹蔘 투여군 및 CCl₄+茵蔯清肝湯加味方 투여군 모두 99% 신뢰도로 마우스 간조직의 섬유화 억제효과가 현저한 것으로 나타났다.

이상의 결과에서, 三稜·蓬朮과 丹蔘은 간섬유화 진행기간이 비교적 길었던 경우에서 섬유화 억제효과가 있었으며, 茵蔯清肝湯加味方은 간섬유화의 진행기간이 급성적이든 중장기적이든 간섬유화가 유발된 모든 경우에서 섬유화 억제효과가 있는 것으로 판단되었으며, 특히 섬유화 유발기간이 길수록 현저한 효과가 있는 것으로 보아 임상에서 바이러스성 만성간염에서 진행한 간경변증에서 치료효과가 있을 것으로 기대된다. 향후 만성 간섬유화를 유발한 실험에서 茵蔯清肝湯加味方의 섬유화 억제효과에 대한 심도있는 연구가 필요하다고 사료된다.

결론

茵蔯清肝湯加味方과 三稜·蓬朮 및 丹蔘이 마우스 간조직의 섬유화 억제에 미치는 영향을 알아보기 위

해 CCl₄로 급성 및 아급성간섬유화를 유발한 다음 collagen type IV 발현 억제 정도를 western blot과 quantitative RT-PCR로 측정하고 간장의 육안적 검사 및 병리조직학적 검사들(Hematoxylin & Eosin stain, Reticulin stain, Masson-Trichrome stain)을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Western Blot 결과, 급성 및 아급성 간섬유화유발군에서 茵蔯清肝湯加味方 투여군, 三稜·蓬朮투여군 및 丹蔘 투여군 모두 CCl₄투여군에 비해 collagen type IV의 발현이 현저히 감소되었다.

2. Quantitative RT-PCR 결과, 급성간섬유화유발군에서 茵蔯清肝湯加味方 투여군은 CCl₄투여군에 비해 collagen type IV 유전자 발현을 억제시켰다. 아급성간섬유화유발군에서는 茵蔯清肝湯加味方 투여군, 三稜·蓬朮 투여군 및 丹蔘 투여군 모두 CCl₄투여군에 비해 collagen type IV 유전자 발현이 억제되었다.

3. 간장의 육안적 관찰 결과, 급성 및 아급성 간섬유화유발군에서 CCl₄투여군에 비해 三稜·蓬朮 투여군은 정도와 중등도의, 丹蔘 투여군은 각각 중등도의, 茵蔯清肝湯加味方 투여군에서는 급성 및 아급성 모두 간조직손상의 회복효과가 현저하였다.

4. 병리조직학적 검사 결과, CCl₄투여군에 비해 三稜·蓬朮 투여군은 급성 및 아급성 모두 정도의, 丹蔘 투여군은 중등도 및 정도의, 茵蔯清肝湯加味方 투여군에서는 급성 및 아급성 모두 소엽구조와 세망조직의 보존, 염증·괴사·섬유화의 억제 및 collagen의 발생저하가 현저하게 관찰되었다.

이상에서 茵蔯清肝湯加味方은 collagen type IV의 발현 및 간조직의 섬유화 억제작용이 뚜렷하여 임상에서 만성바이러스성 간염에서 간경변증으로의 이행을 억제하는데 효과적으로 활용할 수 있는 처방으로 판단된다. 향후 인체 바이러스성 간질환에서의 조직변화와 유사한 섬유화 유발 병태모델 개발 및 만성 간섬유화를 유발한 경우에서 茵蔯清肝湯加味方의 섬유화 억제효과에 대한 심도있는 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

1. 김정룡. 소화기계 질환. 서울:일조각. 2000:497,540.
2. 정영화. B형 만성간염에 대한 항바이러스 요법의 현재와 미래. 내과학의 최신지견. 서울:한국의학. 1999:77-80.
3. 김현옥, 권오헌. 자가 공혈자와 지정 공혈자에서의 수혈전 혈청학적 검사. 대한수혈학회지. 1992;3(2): 137-141.
4. Sheila Sherlock. 간·담도질환. 서울:고려의학. 1989:343-347.
5. 통계청. 99년도 사망원인통계결과. 2000:1-40.
6. 경희대학교 한의과대학 부속 한방병원. 慶熙韓方處方集. 서울:트윈기획. 1997:244.
7. 金榮哲, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯의 安全性에 關한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1997;20(1):57-89.
8. 金珍珠. 茵陳清肝湯이 MHV-2로 유발된 마우스의 損傷肝에 미치는 영향. 慶熙大學校 大學院. 1996.
9. 禹弘楨. 만성B형간염에 대한 茵陳清肝湯의 효과. 제 2回 韓·中 學術大會參加 論文集-肝臟病-. 1995:18-53.
10. 姜京兌, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯加味方이 實驗的 흰쥐의 肝硬變症에 미치는 영향. 慶熙韓醫大論文集. 1997;20(2):133-150.
11. 朴容禎, 金榮哲, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯加味方이 간세포의 增殖能力에 미치는 영향. 大韓韓醫學會紙. 1998;19(1):145-164.
12. 洪尙勳, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯加味方이 간세포 활성화세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會紙. 1998;19(2):337-372.
13. 고흥, 이장훈, 우홍정. 茵陳四苓散 분획물이 간세포 활성화, 세포주기 및 Fas-Mediated Apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會紙. 2000;21(3):174-185.
14. Yi Jong-Hoon, Lee Jang-Hoon, Woo Hong-Jung. Effects of Five Fraction of Artemisia Capillaris THUMB on Fas-mediated Apoptosis in HepG2 Cells. Journal of Oriental Medicine. 1999:41-45.
15. 이지현, 이장훈, 우홍정. 茵陳분획물이 인체 간세포 의 TGF-β1 induced apoptosis에 미치는 영향. 大韓韓醫學會紙. 2000;20(1):53-61.
16. 신상만, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳이 TGF-β1 유도 성 간섬유화에 미치는 영향. 大韓韓醫學會紙. 2001;22(3):141-155.
17. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1986:455-457.
18. 楊東喜. 本草備要解釋. 臺北:國興出版社. 中華69年:167,169.
19. 新文豐出版公司編. 新編中藥大辭典. 臺北:新文豐出版社. 1985:566-567.
20. 趙和平, 王好善, 郭雪萍, 張建說, 李清甫, 申紀軒. 重用丹參注射液治療乙型肝炎117例. 中國中西醫結合雜誌. 1995;15(10):624.
21. 熊麗蘭, 朱世才, 曹國鳴. 參聯合硫酸鎂治療失代償期 肝硬化臨床觀察. 中國中西醫結合雜誌. 1995;15(6):364-365.
22. 張素華, 洪秀英. 中藥與丹參注射液治療肝硬化腹水治 療觀察. 中國中西醫結合雜誌. 1997;10(21):2091.
23. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해 서. 서울. 한국메디칼인덱스사. 1989:109,194,527.
24. 보건복지부. 한국인 압등록 조사자료 분석 보고서. 1997:16-21.
25. 박용욱, 서강석, 한상우, 김신목, 최성규, 서순팔, 김세 중. 만성간염 환자의 혈청에서 중합효소연쇄반응을 이용한 HBV DNA 및 HCV RNA 검출소견. 대한내 과학회지. 1996;50(5):651-659.
26. 김영수, 이광재, 문영수, 함기백, 김진홍, 조성원, 이상 인, 심찬섭. 간세포암에서 B형 간염 바이러스와 C형 간염 바이러스의 감염 양상. 대한간학회지. 1996;2(1):61-67.
27. 정영화, 전용철, 양석균, 민영일. HBsAg 음성 만성 간질환 환자에서 중합효소연쇄반응법을 이용한 B 형 간염 바이러스 DNA 및 C형 간염 바이러스 RNA 의 검출. 대한소화기병학회지. 1992;24(5):1015-1022.
28. Ishak KG. Chronic hepatitis. morphology and nomenclature. Mod Pathol. 1994;7:690-713.
29. Phillips MJ, Poucell S. Modern aspects of the

- morphology of viral hepatitis. *Hum Pathol.* 1981;12:1060-1084.
30. Ishak KG. Light microscopic morphology of viral hepatitis. *Am J Clin Pathol.* 1994;65:787-827.
 31. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1985:66.
 32. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院. 1985:78,249,309.
 33. 張仲景. 仲景全書. 서울:大成文化社. 1884:225, 240,249,250,408,411.
 34. Shaffner J, Popper H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology.* 1963;44:239.
 35. Matsumoto E, Muragaki Y, Ooshima A. Increased serum type collagen and laminin related antigen in human serum in alcoholic liver disease. *Eur J Clin Invest.* 1985;15:132.
 36. Hahn E, Wick G, Pencev D, Tipl R. Distribution of basement membrane protein in normal and fibrotic human liver: Collagen type IV, laminin and fibronectin. *Gut.* 1980;21:63-71.
 37. Ueno T, Inuzuka S, Torimura T. Significance of serum type IV collagen levels in various liver disease: Measurement with a one step sandwich enzyme immunoassay using monoclonal antibodies with specificity for pepsin solubilized type IV collagen. *Scand J Gastroenterology.* 1992;27:513.
 38. Timpl R, Weidemann H, Van Delden V. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem.* 1984;120:203.
 39. Nakayama Y, Takahara T. Ultrastructural localization of type IV collagen and laminin in the disse space of rat liver with carbon tetrachloride induced fibrosis. *Liver.* 1991;11:260.
 40. Bedossa P, Hougoum K. Stimulation of collagen $\alpha 1(I)$ gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury. A link to tissue fibrosis?. *Hepatology.* 1994;19:1262-1271.