

麻黃과 Silymarin의 병용이 TGF- β /Smad 경로 억제를 통한 간섬유화 억제효능

박상미^{1#}, 진효정¹, 김예림¹, 박숙자², 김상찬^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학, 2 : 대구한의대학교 제약공학과

Combination of EHE and Silymarin ameliorates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad pathway in LX-2 cells

Sang Mi Park^{1#}, Hyo Jeong Jin¹, Ye Lim Kim¹, Sook Jahr Park², Sang Chan Kim^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University

2 : Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Ephedrae Herba has been used in the East Asian traditional medicine, for treatment of asthma, cold and influenza. Silymarin is an effective antioxidant and its anti-fibrogenic, anti-inflammatory, and hepatoprotective properties have been reported. This study was performed to explore an anti-fibrogenic potential of Ephedrae Herba extract (EHE) + silymarin on immortalized human hepatic stellate cell line, LX-2 cells.

Methods : We studied the anti-fibrogenic effects of EHE + silymarin on transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling pathway in LX-2 cells. Cell viability was measured using the MTT assay. mRNA levels were detected by real-time PCR. TGF- β 1 signaling-related proteins expression were detected by Western blot.

Results : Silymarin 30 μ g/mL and EHE 100 μ g/mL showed cytotoxicity on LX-2 cells. Therefore, the concentrations of silymarin and EHE were studied at 10 μ g/mL, respectively. Silymarin significantly reduced PAI-1 protein expression, Smad binding element (SBE) luciferase activity, and mRNA (*PAI-1*, *MMP2* and *9*) expression compared to TGF- β 1. EHE significantly reduced SBE luciferase activity and mRNA (*PAI-1*, *MMP2* and *9*) expression compared to TGF- β 1. More importantly, EHE + silymarin significantly reduced all parameters compared to TGF- β 1, and also significantly reduced compared to EHE alone and silymarin alone.

Conclusion : The results indicate that EHE + silymarin has anti-fibrogenic effect in LX-2 cells induced by TGF- β 1. Additionally, EHE + silymarin shows more effective anti-fibrogenic effect than EHE alone and silymarin alone.

Key words : Ephedrae Herba, Silymarin, Liver fibrosis, LX-2 cell, TGF- β 1/Smad.

I. 서 론

麻黃 (Ephedrae Herba)은 마황과에 속한 다년생 초본의
小灌木인 초마황 (*Ephedra sinica* Stapf), 목적마황 (*E.*

*Corresponding author : SC Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Formula, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1862

· Fax : +82-53-819-1860

· E-mail : sckim@dhu.ac.kr

#First author : SM Park, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, College of Korean Medicine, Daegu Haany university, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1869

· Fax : +82-53-819-1860

· E-mail : miya38@nate.com

· Received : 10 June 2024

· Revised : 06 July 2024

· Accepted : 25 July 2024

equisetina Bunge), 중마황 (*E. intermedia* Schrenk & C.A.Mey)의 지상부 草質莖으로, 辛·微苦·溫·無毒하며, 肺·膀胱의 二經에 작용한다. 發汗解表, 宣肺平喘, 利水通淋, 溫散寒邪의 효능이 있어, 外感風寒表實證, 風寒外束으로 인한 肺氣壅遏咳喘, 水腫兼表證, 風濕肢節痺痛, 陰疽 등의 증에 사용된다¹⁾. 麻黃에 대한 연구로는 감별연구^{2,3)}, 지질대사 및 비만에 관한 연구⁴⁻⁸⁾, 천식에 대한 연구⁹⁾, 적정 용량에 대한 연구¹⁰⁾, 체질에 대한 연구¹¹⁾, 도핑 안전성에 대한 연구¹²⁾, 비만 치료시 안전성에 대한 연구¹³⁾, rat에서 급성 경구투여 독성 시험 연구¹⁴⁾, rat에서 아급성 경구 독성 시험 연구¹⁵⁾ 및 본 연구실에서 보고한 LX-2 세포에서의 항섬유화에 대한 연구¹⁶⁾ 등이 보고되어 있다.

한편 silymarin은 밀크씨슬 (milk thistle; *Silybum marianum*)의 씨앗에서 추출한 것으로, 간보호 및 항섬유화를 비롯한 간질환을 치료하는 데 빈용된다^{17,18)}. 간과 silymarin에 대한 이전의 연구에 따르면, silymarin은 free radical scavenger 역할을 하여 산화적 스트레스와 그에 따른 세포 독성을 감소시켜 손상되지 않은 간세포나, 회복 불가능까지는 손상되지 않은 세포를 보호할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 silymarin은 간경변증 환자 대상 임상시험 분석에서 간 관련 사망의 감소를 유도하였으며, 더욱이 약인성 간 손상 환자에게도 silymarin은 유의한 것으로 보고되었다^{19,20)}. 특히 섬유화에 대하여서는 간섬유화²¹⁾ 외에도 silymarin은 장기간의 복막투석으로 유도될 수 있는 복막 섬유증 (peritoneal fibrosis)에서 TGF- β /Smad signaling의 억제를 통하여 복막 섬유증의 예방과 치료에 유의함이 보고되었다²²⁾. 안전성에 있어서도 silymarin은 안전성이 우수하며 부작용 발생률이 낮고, 임상 시험에서 치료와 관련한 심각한 부작용이나 사망례가 없었으며²⁰⁾, 단순한 위장 장애 및 알레르기성 피부 발진에 대한 드문 사례 보고만 발표되었다¹⁹⁾. 항섬유화 효과에 있어서 silymarin과의 병용연구에 관한 연구로는, silymarin과 caffeine 병용²³⁾, silymarin과 sitagliptin의 병용²⁴⁾, silymarin과 生薑 병용²⁵⁾, silymarin과 梔子 (*Gardeniae Fructus*) 병용의 항섬유화 효과²⁶⁾ 등이 보고되었다.

본 연구실에서는 <臟腑辨證論治>²⁷⁾의 '肝膽病의 治療 및 常用藥物' 및 '肝病의 證治'에서 제시된 130여 종의 약재 중 TGF- β 1으로 활성화된 LX-2 세포에서 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 발현을 60% 이상 억제하는 9종의 약물 중 하나인 麻黃에 대한 항섬유화 효과를 발표하였다¹⁶⁾. 본 연구에서는 麻黃의 간섬유화 예방 및 치료 효능에 대한 활용도 제고 및 효력, 효능을 제고하기 위하여 麻黃과 silymarin을 병용하여, TGF- β 1으로 활성화된 간성상세포주에서 섬유화와 관련된 인자들을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

세포배양에 필요한 Williams' media E, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum

(FBS), L-glutamine, penicillin-streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였고, TGF- β 1은 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Anti-PAI-1, anti-phospho-Smad2 (p-Smad2), anti-p-Smad3 및 anti-Smad2/3와 horseradish peroxidase가 결합된 이차 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Silymarin, Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), anti- α smooth muscle actin (α -SMA), anti- β -actin 및 기타 시약류는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 麻黃 열수 추출물 (Ephedrae Herba water extract; EHE) 제조

麻黃은 대원약품사 (Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 麻黃 100 g을 물 1.2 L에 넣고 열수 추출하였다. 300 mm filter paper (Toyo Roshi KaishaLtd, Tokyo, Japan)로 추출액을 여과한 후 여과액을 회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축액을 Ultra-low temperature freezer (Operon, Korea)에 동결하고, 이를 동결건조기 (LABCONCO, MO, USA)로 건조하여 최종적으로 동결건조물을 수득하였다 (수율 23.26%). 麻黃 추출물은 사용 때까지 -20°C에서 보관하고, 실험 직전 麻黃 추출물을 물에 녹여 0.22 μ m filter (Millipore, MA, USA)로 여과한 후 사용하였으며, silymarin은 DMSO에 녹여 처치하였다.

3. 세포배양

세포배양은 이전의 연구방법²⁸⁾과 동일하게 진행하였다. 즉, LX-2 세포 (간성상세포, HSC; human hepatic stellate cell)는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine을 포함하는 DMEM으로 배양하였으며, t-HSC/C16 세포는 FBS 및 1% penicillin-streptomycin, L-glutamine이 포함된 Williams' media E를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. LX-2 세포는 배양 dish 바닥 면적의 80% 이상 성장하였을 때 FBS가 포함되지 않은 배지로 교환하여 5시간 동안 추가 배양한 후, 1-100 μ g/mL의 EHE, 1-30 μ g/mL의 silymarin, 5 ng/mL의 TGF- β 1을 실험 목적에 따라 처치하였다.

4. 세포생존을 측정

LX-2 세포를 8×10^4 cells/well로 분주하여 1-100 μ g/mL의 EHE 및 1-30 μ g/mL의 silymarin을 24시간 동안 처치한 후 0.5 mg/mL의 MTT 용액과 2시간 반응시키고, 생성된 formazan을 DMSO로 용해시켜 570 nm에서 microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 상대적인 세포생존율은 무처리 control 세포군에 대한 백분율로 나타내었다.

5. 전세포 추출액 제조 및 immunoblot 분석

EHE 및 silymarin, TGF-β1 등을 목적에 맞게 처치한 후 수거한 LX-2 세포는 radioimmnoprecipitation buffer와 Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 혼합한 lysis buffer를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시키고 15,000 × g에서 10분 동안 원심분리한 후의 상층액을 전세포 추출액 (whole cell lysates)으로 취하였다. 전세포 추출액은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific)를 사용하여 단백질을 정량하였고 추출한 단백질을 Laemli's sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 섞어 5분간 끓인 후, 10% polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이하여 일차항체 및 이차항체와 순차적으로 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)와 Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 단백질 발현 정도를 관찰하였다. 각 발현된 단백질은 ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) 정량 분석을 실시하였다.

6. 리포터 유전자 분석

Smad binding element (SBE) 매개 전사 활성 측정을 위해 리포터 유전자 pGL4.48[luc2p/SBE/Hygro] (Promega, Madison, WI, USA)가 형질 도입된 재조합 t-HSC/Cl6 세포를 이용하여 각각의 약물을 처치한 후 세포를 passive lysis buffer (Promega)로 용해하였다. Luciferase Reporter Assay System™ kit (Promega)를 이용하여 luciferase 활성을 측정하고 단백질 농도로 보정하였다.

7. real-time PCR 분석

실시간 PCR 분석은 이전의 연구방법²⁸⁾과 동일한 방법으로, 각각의 약물들을 처치한 후 수거한 LX-2 세포로부터 TRIzol reagent (Thermo Scientific)를 이용하여 total RNA를 분리하였고 total RNA (2 μg)와 d(T)₁₆ primer 및 AMV 역전사 효소 (reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 PCR 분석은 SYBR Ex Taq (TaKaRa, Shiga, Japan)과 CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad)를 사용하였다. 분석에 사용한 primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하였고 종류와 sequence는 table 1과 같다. 유전자의 상대 정량은 GAPDH 유전자의 발현량을 기준으로 2^{-DDCT}법에 의해 분석하였다.

8. 통계적 검증

실험의 결과는 3회 반복 시행한 후 mean ± S.D.로 나타내었다. 각 그룹 간의 통계적 유의성은 one way analysis of variance를 사용하였으며, 사후검정은 등분산가정이 성립하였을 때에는 Tukey HSD test를 사용하였고, 등분산 가정이 성립하지 않았을 경우에는 Dunnett test를 사용하였다. 통계적 유의성 검증은 P < 0.05 또는 P < 0.01로 하였다.

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR analysis.

Product		Sequence
PAI-1	Sense	5'-TCGTCCAGCGGGATCTGA-3'
	Antisense	5'-CCTGGTCATGTTGCCTTTC-3'
MMP2	Sense	5'-GTATTTGATGGCATCGCTCA-3'
	Antisense	5'-CATTCCTGCAAAGAACACA-3'
MMP9	Sense	5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3'
	Antisense	5'-GCCACTTGTGCGCGATAAGG-3'
GAPDH	Sense	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
	Antisense	5'-GAAGATGGTGTATGGGATTC-3'

III. 결 과

1. EHE 및 silymarin이 세포생존율에 미치는 영향

먼저, 간성상세포주인 LX-2 세포에서 EHE와 silymarin의 세포독성을 각각 평가하였다. EHE는 1-100 μg/mL, silymarin은 1-30 μg/mL의 농도로 각각 24시간 처치한 후 MTT assay를 통하여 세포생존율을 측정하였다.

EHE 1-30 μg/mL을 처치한 경우는 control군에 비하여 유의한 세포생존율의 변화를 나타내지 않았고, EHE 100 μg/mL을 처치한 경우는 control (100.00 ± 1.18%) 대비 77.74 ± 10.87%로 유의한 세포독성을 나타내었다. Silymarin 1-10 μg/mL을 처치한 경우는 control군에 비하여 유의한 세포생존율의 변화를 나타내지 않았고, silymarin을 30 μg/mL을 처치한 경우는 control (100.00 ± 7.23%) 대비 69.77 ± 1.58%로 유의한 세포독성을 나타내었다 (Fig. 1).

2. Silymarin이 PAI-1의 발현에 미치는 영향

TGF-β1/Smad 경로의 활성화는 섬유화와 관련된 유전자의 전사를 조절하며, TGF-β1의 주요 표적 유전자인 PAI-1은 만성 섬유화 질환의 주요 인자이다^{29,30)}. Silymarin의 항섬유화를 평가하기 위하여 TGF-β1으로 활성화된 LX-2 세포에서 PAI-1의 단백질 발현 수준을 분석하였다.

PAI-1 단백질의 발현은 TGF-β1 처치군에서는 13.44 ± 0.55배로 control (1.00 ± 0.13) 대비 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 μg/mL군은 8.96 ± 0.60배로 TGF-β1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. 또한 silymarin 30 μg/mL 군 역시 0.36 ± 0.03배로 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 2), silymarin 30 μg/mL군은 Fig. 1의 결과에서 세포독성을 나타내었다.

이러한 연구결과를 바탕으로 이후의 EHE + silymarin 연구는 silymarin의 농도는 10 μg/mL, EHE의 농도는 이전의 연구결과에¹⁶⁾ 따라 10 μg/mL의 농도로 연구하였다.

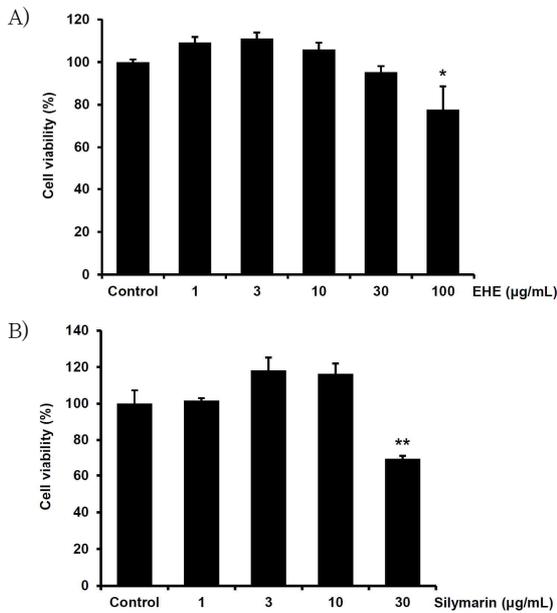


Fig. 1. Effect of EHE and silymarin on LX-2 cell viability. Relative cell viability was assessed by MTT assay. LX-2 cells were starved for 5 h and incubated with different concentrations of (A) EHE (1, 3, 10, 30, 100 µg/mL) and (B) silymarin (1, 3, 10, 30 µg/mL) for 24 h. Data represent mean ± SD of three independent experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control cells)

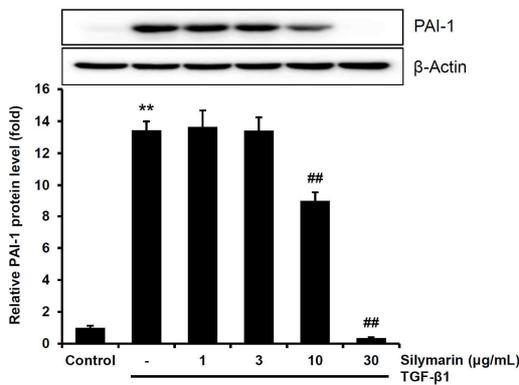


Fig. 2. Effect of silymarin on TGF-β1-stimulated PAI-1 expression. LX-2 cells were pre-treated with indicated concentrations of silymarin (1, 3, 10, 30 µg/mL) for 1 h, then stimulated with the 5 ng/mL of TGF-β1 for 24 h. The expression of TGF-β1-induced PAI-1 was analyzed by Western blot. Relative expression of PAI-1 was quantified by densitometry scan. β-actin was used as a loading control. Results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. (** $p < 0.01$ compared with control cells; ### $p < 0.01$, compared with TGF-β1 treated cells)

3. EHE + silymarin이 PAI-1 및 α-SMA 발현에 미치는 영향

TGF-β1/Smad 경로의 활성화는 섬유화와 관련된 유전자의 전사를 조절한다. TGF-β1의 주요 표적 유전자인 PAI-1은 만성 섬유화 질환의 주요 인자이며^{29,30}, 또한 TGF-β1은 인간 간성상세포에서 α-SMA 발현을 유도하므로³¹, TGF-β1으로 활성화된 LX-2 세포에서 PAI-1과 α-SMA의 발현에 대한

EHE+ silymarin의 효과를 살펴보았다.

PAI-1 단백질의 발현은 TGF-β1처치군에서는 12.43 ± 0.68 배로 control (1.00 ± 0.26) 대비 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 µg/mL군은 9.03 ± 1.11 배로 TGF-β1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, EHE 10 µg/mL군은 13.64 ± 1.10 배로 유의한 결과를 나타내지 않았다. 그러나 EHE + silymarin군은 5.08 ± 0.97 배로 TGF-β1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 µg/mL군 및 silymarin 10 µg/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 3A).

α-SMA의 발현은 TGF-β1처치군에서는 1.95 ± 0.11 배로 control (1.00 ± 0.24) 대비 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 µg/mL군은 1.63 ± 0.20 배, EHE 10 µg/mL군은 2.44 ± 0.14 배로 TGF-β1처치군 대비 유의한 감소를 나타내지 못하였다. 그러나 EHE + silymarin군은 1.01 ± 0.25 배로 TGF-β1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 µg/mL군 및 silymarin 10 µg/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 3B).

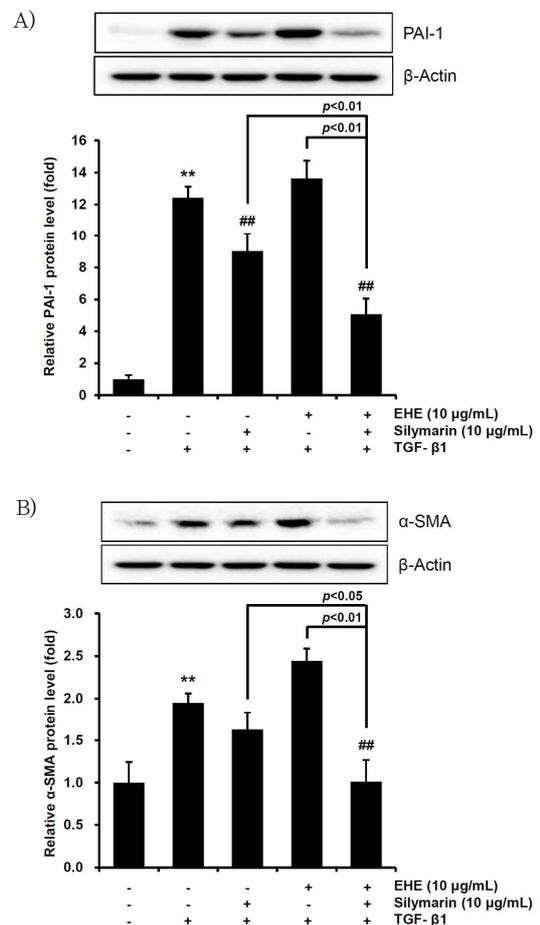


Fig. 3. Effect of EHE + silymarin on TGF-β1-stimulated PAI-1 and α-SMA expressions.

LX-2 cells were pre-treated with 10 µg/mL of EHE or silymarin for 1 h, then stimulated with the 5 ng/mL of TGF-β1 for 24 h. (A) The expressions of TGF-β1-induced PAI-1 and (B) α-SMA were analyzed by Western blot. Relative expression of the bands were quantified by densitometry scan. β-actin was used as a loading control. Results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. (** $p < 0.01$ compared with control cells; ### $p < 0.01$, compared with TGF-β1 treated cells)

4. EHE + silymarin이 Smad의 인산화에 미치는 영향

일반적으로 활성 TGF-β1은 TGF-β 수용체 (TGF-βR II, TGF-βR I)와 결합하여 Smad2와 Smad3를 인산화하고, 인산화된 p-Smad2와 p-Smad3는 핵으로 전위하여 섬유화 관련 유전자의 전사를 유도하고, 세포외기질 (ECM; extracellular matrix)을 축적한다³²⁾.

본 연구에서 p-Smad2의 발현은 TGF-β1처리군에서는 control (1.00 ± 1.57) 대비 24.47 ± 0.89배로 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 μg/mL군은 20.24 ± 3.54배, EHE 10 μg/mL군은 17.44 ± 3.35배로 TGF-β1처리군 대비 유의한 감소를 나타내지 않았으나, EHE + silymarin군은 9.86 ± 3.35배로 TGF-β1처리군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 μg/mL군 및 silymarin 10 μg/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 4A and B).

p-Smad3의 발현은 TGF-β1처리군에서는 control (1.00

± 0.41) 대비 20.92 ± 2.68배로 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 μg/mL군은 17.80 ± 2.55배, EHE 10 μg/mL군은 15.38 ± 2.65배로 TGF-β1처리군 대비 유의한 감소를 나타내지 않았으나, EHE + silymarin군은 9.63 ± 1.16배로 TGF-β1처리군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 μg/mL군 및 silymarin 10 μg/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 4A and C).

Smad 결합영역 (SBE) luciferase 활성에서 TGF-β1처리군에서는 control (1.00 ± 0.33) 대비 19.25 ± 1.07배로 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 μg/mL군은 8.54 ± 2.74배로 TGF-β1처리군 대비 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 나타내었으며, EHE 10 μg/mL군 역시 14.97 ± 0.22배로 TGF-β1처리군 대비 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 또한 EHE + silymarin군은 2.49 ± 1.38배로 TGF-β1처리군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 μg/mL군 및 silymarin 10 μg/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 4D).

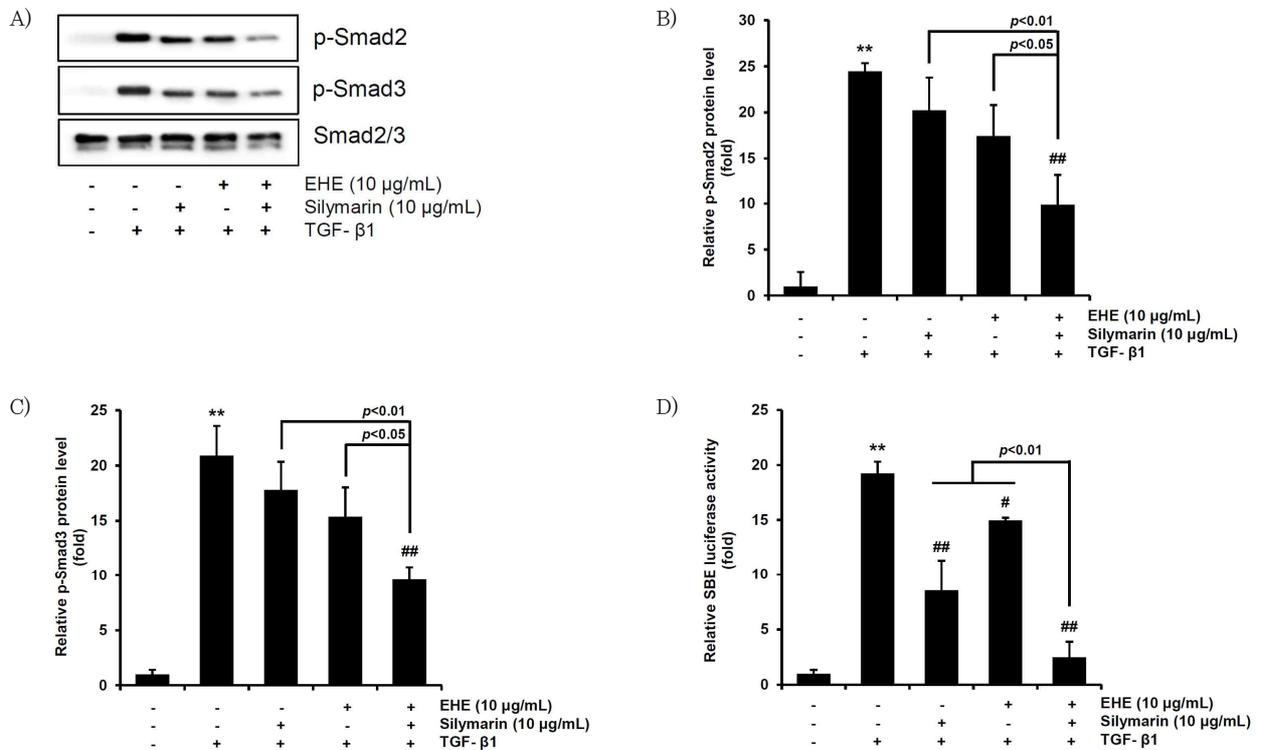


Fig. 4. Inhibitory effect of EHE + silymarin on TGF-β1/Smad pathway.

(A) The levels of Smads phosphorylation induced by TGF-β1 were analyzed by western blot. Serum-starved LX-2 cells were pre-treated with incubated with EHE (10 μg/mL) or silymarin (10 μg/mL) for 1 h, then stimulated with the 5 ng/mL of TGF-β1 for 1 h. Whole cell lysates were blotted. Smad2/3 was used as a loading control. (B and C) The relative expressions of p-Smad2 and p-Smad3 were quantified by densitometry scan. (D) Recombinant t-HSC/C16 cells which express pGL4.48 were incubated with EHE (10 μg/mL) or silymarin (10 μg/mL) for 1 h followed by stimulation with 5 ng/mL of TGF-β1 for 24 h. All data represent the means ± SD of three independent experiments (** $p < 0.01$ compared with control cells; ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ compared with TGF-β1 treated cells).

5. EHE + silymarin이 PAI-1 및 MMP의 mRNA 발현에 미치는 영향

EHE + silymarin이 TGF-β1에 의한 PAI-1의 단백질수

준을 유의하게 억제하였으므로, PAI-1 및 TGF-β1 표적 유전자 중 하나인 MMP의 mRNA 발현에 미치는 효과를 실시간 (real-time) PCR로 분석하였다.

PAI-1의 발현은 TGF-β1처리군에서는 control (1.00 ±

0.54) 대비 25.44 ± 1.52 배로 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군은 12.80 ± 1.35 배, EHE 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 군은 12.89 ± 2.39 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 특히 EHE + silymarin군은 4.53 ± 1.00 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군 및 silymarin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다. (Fig. 5A)

MMP2의 발현은 TGF- β 1처치군에서는 3.54 ± 0.38 배로 control (1.00 ± 0.11) 대비 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군은 2.10 ± 0.34 배, EHE 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 군은 2.02 ± 0.54 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE + silymarin군은 0.77 ± 0.37 배로

TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군 및 silymarin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다. (Fig. 5B) MMP9의 발현은 TGF- β 1처치군에서는 3.82 ± 0.62 배로 control (1.00 ± 1.37) 대비 유의하게 증가하였으며, silymarin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군은 2.57 ± 0.50 배, EHE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군은 2.31 ± 0.22 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE + silymarin군은 1.07 ± 0.45 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군 및 silymarin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다. (Fig. 5C)

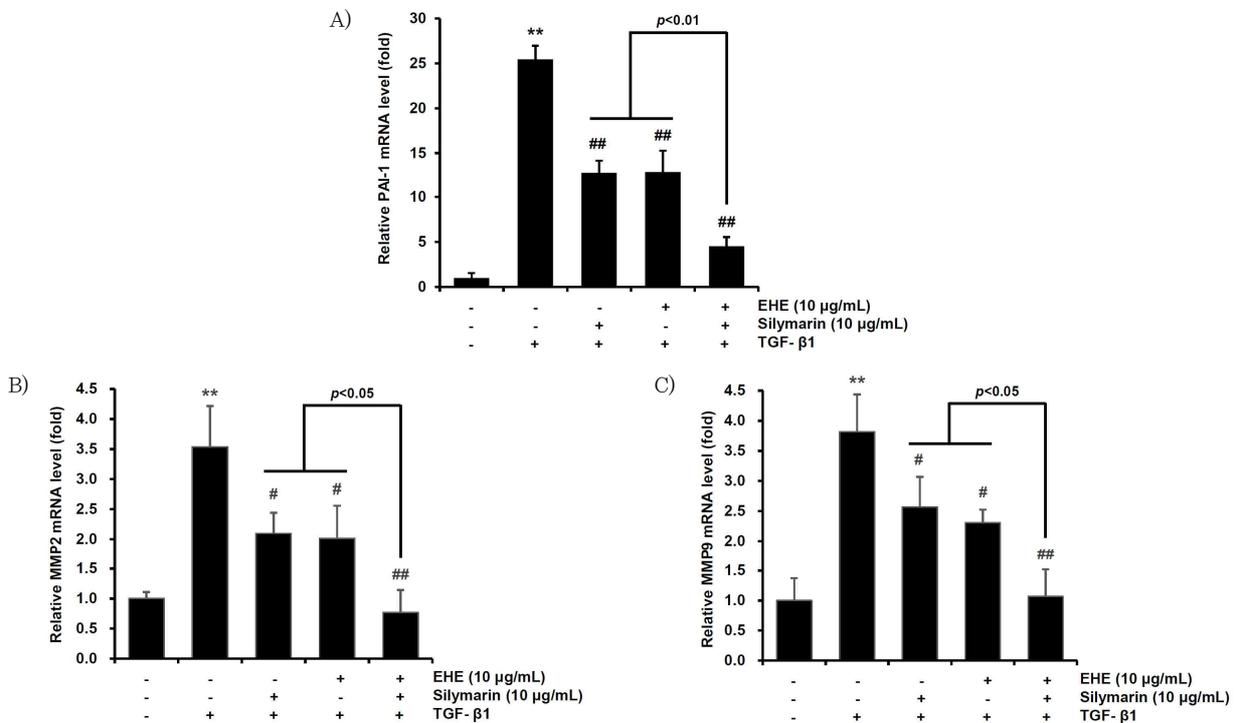


Fig. 5. Inhibitory effect of EHE + silymarin on the TGF- β 1-induced PAI-1, MMP2 and 9 gene expressions. Serum-starved LX-2 cells were pre-treated with EHE (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or silymarin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h, then stimulated with the 5 ng/mL of TGF- β 1 for 6 h. Real-time PCR analysis was used to detect the expressions of (A) PAI-1, (B) MMP2 and (C) MMP9. All data represent the means \pm SD of three independent experiments (**p < 0.01 compared with control cells; ##p < 0.01, #p < 0.05 compared with TGF- β 1 treated cells).

IV. 고찰

마황 (Ephedrae Herba)은 發汗, 祛寒, 化痰, 利水之品으로³³⁾ 주로 肺의 宣發과 肅降의 기능을 개선시킨다. 현재까지 麻黃에 대한 연구로는 호흡기 질환에 대한 연구^{9,34,35)}, 지질대사 및 비만에 관한 연구^{4-8,36-40)}, 체질에 관한 연구¹¹⁾, 항염증 연구⁴¹⁻⁴³⁾, 안전성 연구¹²⁻¹⁵⁾, 적정 용량에 대한 연구¹⁰⁾가 이루어져 왔으며, 간과 관련한 연구는 본 연구실에서 보고한 간성상세포에서의 항섬유화 효능¹⁶⁾이 보고되었다.

일반적으로 비알콜성지방간 (NAFLD; non-alcoholic fatty

liver disease progression)은 정상간 (Fat in <5% of hepatocyte)에서 비알콜성지방간 (NAFL: non-alcoholic fatty liver; Fat in >5% of hepatocyte), 지방간·염증·섬유화를 포함하는 비알콜성지방간염 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis), 섬유화 비알콜성지방간염 (NASH with fibrosis), 섬유화의 최종단계인 경화성 비알콜성지방간염 (NASH with cirrhosis), 간암 (HCC; hepatocellular carcinoma)의 순서로 진행된다⁴⁴⁾.

간경변증은 세계적으로 14번째로 흔한 사망 원인이며, 1년 사망률은 간경화의 단계에 따라 1%에서 57%에 이른다. 간경

변증은 괴사염증 (necroinflammation) 및 섬유화 (fibrogenesis)를 유발하는 간 손상의 다양한 기전으로 인해 발생하며, 조직학적으로는 치밀한 섬유성 격막으로 둘러싸인 확산 결절성 재생 (diffuse nodular regeneration)과 그에 따른 간 조직의 소멸 및 붕괴를 특징으로 하며, 간 혈관 구조의 뚜렷한 왜곡을 유발한다⁴⁵⁾.

이 중 간섬유화는 만성 간질환으로, 반복적인 간 손상 및 손상의 회복과 재생과정에서 fibrillar collagen이 풍부한 세포외기질 (ECM; extracellular matrix) 단백질이 다량으로 축적되어 발생한다^{46,47)}. 간 손상이 발생하면, 괴사성 및 세포 사멸성 간세포를 회복시키기 위한 메커니즘이 개시되어 간 재생에 필수적인 상처 치유 및 염증 반응이 생성되지만, 이러한 손상이 반복적, 장기적으로 지속되면 ECM 단백질 (collagens I, II, III, undulin, fibronectin, laminin, elastin, proteoglycans, hyaluronan 등)이 과도하게 축적되어, 간섬유화 및 간경화를 유도한다⁴⁸⁾.

간에는 간실질세포 (hepatocyte), 쿠퍼세포 (Kupffer cell), 내피세포 (endothelial cell), 성상세포 (HSC; hepatic stellate cell) 등 다양한 세포가 존재하지만, 간 섬유화와 관련된 중심적 세포는 간 성상세포이다. 정상 상태의 간에서 HSC는 ECM의 항상성 유지, 간의 정상적 발달, retinoid 대사, 약물 대사 및 해독, 간실질세포의 mass 유지, 혈관의 tension 조절 등의 역할을 한다⁴⁹⁾. 그러나 HSC가 활성화되어 lipid droplet 손실과 혈소판 유래 성장 인자 (platelet-derived growth factor; PDGF) 수용체, fibrillar collagen 및 α -smooth muscle actin (α -SMA)과 같은 유전자의 발현을 수반하여 ECM의 침착 및 matrix stiffness의 증가로 이어진다⁴⁹⁻⁵¹⁾.

HSC의 활성화는 다양한 방면에서 유도될 수 있다. 즉 간실질세포 손상으로 인한 free radical 및 TGF- β 1, TNF- α , FGF, IGF 등이 HSC의 활성화를 유도할 수 있으며, 또한 Kupffer cell 및 T-cell에서 분비되는 free radical, IL-6, IFN- γ , TGF- β 1, TNF- α , IGF 및 담낭세포에서 분비되는 TNF- α , endothelin-1, PDGF 등도 HSC의 활성화를 유도할 수 있다⁴⁶⁾. 그러나 이 중 간 섬유화에 있어 가장 관련성이 큰 인자는 TGF- β 1이다. TGF- β 1은 TGF- β 수용체 매개 canonical (Smad dependent) pathway와 non-canonical (Smad independent) signaling pathway를 통해 quiescent HSC가 α -SMA를 발현하는 activated HSC가 된다^{50,52,53)}.

이 중 Smad dependent pathway는 TGF- β 가 TGF- β 수용체 type I (TGF- β R I) 및 TGF- β 수용체 type II (TGF- β R II)와 결합하고, 활성화된 TGF- β R1은 receptor-associated Smads (R-Smads)의 C-terminal serine residue를 인산화하고, 인산화된 R-Smads는 TGF- β R I로부터 분리되어 common Smad인 Smad4와 heterotrimeric complex를 형성하여 핵으로 전위하여 co-activator와 다른 전사인자와 결합하여 섬유화 관련유전자의 전사를 유도한다^{32,47)}.

본 연구에서는 기 보고된 麻黃의 항섬유화 효능에 대한 후속 연구로 麻黃과 silymarin을 병용하여, 간섬유화에서 핵심적 역할을 하는 HSC에서 TGF- β 1으로 유도된 섬유화 관련 단백질의 발현을 Smad dependent 경로를 위주로 연구하였다.

세포독성을 각각 평가하였다. EHE는 1-30 μ g/mL에서 유의한 세포생존율의 변화를 나타내지 않았고, EHE 100 μ g/mL에서는 유의한 세포독성을 나타내었다. 또한 silymarin 1-10 μ g/mL에서는 유의한 세포생존율의 변화를 나타내지 않았고, silymarin 30 μ g/mL에서는 유의한 세포독성을 나타내었다.

Silymarin의 항섬유화 효과는 잘 알려져 있지만, 본 연구에서 EHE + silymarin의 효능을 평가하기 위해, silymarin이 TGF- β 1 주요 표적 단백질인 PAI-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. PAI-1 단백질의 발현은 silymarin 10 μ g/mL과 30 μ g/mL에 의해 유의한 감소를 나타내었으나, silymarin 30 μ g/mL은 Fig. 1의 결과에서 세포독성을 나타내었다. 이러한 연구결과를 바탕으로 이후의 EHE + silymarin 연구는, silymarin의 농도는 10 μ g/mL, EHE의 농도는 이전의 연구 결과에¹⁶⁾ 따라 10 μ g/mL의 농도로 연구하였다.

EHE + silymarin 연구로는 먼저 plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)과 α -SMA 발현에 미치는 영향을 평가하였다. TGF- β 1/Smad 경로의 활성화는 섬유화와 관련된 유전자의 전사를 조절하며, TGF- β 1의 주요 표적 유전자인 PAI-1은 만성 섬유화 질환의 주요 인자이며^{29,30)}, 또한 TGF- β 1은 인간 간성상세포에서 fibrosis의 marker인 α -SMA 발현을 유도한다³¹⁾.

PAI-1 및 α -SMA 발현에서 silymarin 10 μ g/mL군은 모두 유의한 감소를 나타내었으나, EHE 10 μ g/mL군은 모두 유의한 결과를 나타내지 않았다. 그러나 EHE + silymarin군은 PAI-1 및 α -SMA 모두에서 TGF- β 1처리군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 μ g/mL군 및 silymarin 10 μ g/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다. TGF- β 1은 TGF- β 수용체 (TGF- β R II, TGF- β R I)와 결합하여 Smad2와 Smad3를 인산화하고, 인산화된 Smad2와 Smad3는 핵으로 전위하여 섬유화 관련 유전자의 전사를 유도하고, ECM을 축적하므로³²⁾, EHE + silymarin이 Smad의 인산화에 미치는 영향을 평가하였다. 본 연구에서 TGF- β 1은 p-Smad2와 p-Smad3의 발현을 유의하게 증가시켰고, silymarin 10 μ g/mL군 및 EHE 10 μ g/mL군은 Smad의 인산화를 억제하지 못하였다. 그러나 EHE + silymarin군은 TGF- β 1처리군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 또한 EHE 10 μ g/mL군 및 silymarin 10 μ g/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다. EHE + silymarin에 의해 Smad의 인산화가 억제됨을 확인하고, TGF- β 1/Smad 신호전달에서 Smad 분자의 DNA 결합에 의한 표적 유전자 발현능을 지표할 수 있는 Smad 결합영역 (SBE; smad binding element)을 포함한 리포터 유전자를 LX-2 세포에 도입한 후, SBE 리포터 분석을 실시하였다. TGF- β 1은 SBE luciferase 활성을 현저하게 활성화시켰고, EHE 및 silymarin, EHE + silymarin 군에서 모두 SBE luciferase 활성을 유의하게 감소시켰으며, 특히 EHE + silymarin군은 EHE 10 μ g/mL군 및 silymarin 10 μ g/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다.

EHE + silymarin이 PAI-1 단백질의 발현을 억제함을 확인하고 PAI-1의 mRNA 및 간섬유화에서 증가되는 것으로 보고된 MMP2와 MMP9의 mRNA 수준을 평가하였다.

PAI-1 및 MMP2, MMP9의 real-time PCR 분석결과,

먼저, 간성상세포주인 LX-2 세포에서 EHE와 silymarin의

silymarin, EHE, EHE + silymarin군은 모두 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었으며, 특히 EHE + silymarin군은 EHE 10 μ g/mL군 및 silymarin 10 μ g/mL군과 비교하여서도 유의한 감소를 나타내었다.

이러한 결과는 EHE + silymarin이 TGF- β 1으로 활성화된 Smad 의존적 신호전달에서 Smad의 인산화를 억제하여 간의 섬유화를 억제함을 의미하며, 또한 EHE 단독 및 silymarin 단독처치군이 일부 지표에서는 TGF- β 1에 비교하여 유의한 항섬유화 효과를 나타내었지만, EHE + silymarin군은 모든 지표에서 TGF- β 1뿐만 아니라, EHE 단독 및 silymarin 단독처치군보다 우수한 항섬유화 효과를 나타냄을 의미한다.

본 연구에서는 TGF- β 1/Smad 경로에 대한 EHE + silymarin의 효능만을 평가한 것이므로 향후 Smad independent 경로에 관한 연구도 필요하며, 또한 *in vivo* 연구를 통하여 EHE + silymarin의 항섬유화 효과에 대한 검증 및 이전의 silymarin 병용 연구와의 비교 연구도 부가될 필요성이 있다.

V. 결 론

본 연구에서는 마황 열수 추출물 (EHE)과 silymarin의 병용이 간성상세포주 (LX-2)에서 TGF- β 1에 의한 Smad dependent 신호 전달에서 간섬유화를 억제할 수 있는지를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 마황 열수 추출물은 30 μ g/mL 이하의 농도, silymarin은 10 μ g/mL 이하의 농도에서는 세포 독성을 나타내지 않았다.
2. Silymarin은 10과 30 μ g/mL의 농도에서 PAI-1단백질의 발현을 유의하게 감소시켰다.
3. EHE + silymarin은 섬유화의 마커인 α -SMA의 발현 및 TGF- β 1의 주요 표적 유전자인 PAI-1을 유의하게 억제하였다.
4. EHE + silymarin은 p-Smad2 및 p-Smad3를 유의하게 억제하였으며, 또한 SBE 리포터 유전자 활성을 유의하게 억제하였다.
5. EHE + silymarin은 PAI-1의 발현 및 MMP-2, -9의 발현을 유의하게 감소시켰다.
6. EHE + silymarin은 본 연구의 모든 지표에서 TGF- β 1뿐만 아니라, EHE 단독 및 silymarin 단독처치군보다 유의한 억제를 나타내었다.

감사의 글

This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No.2018R1A5A2025272)

References

1. Shin MK. Clinical herbology. Seoul:Younglimsa, 1997:322-3.
2. Park BR, Lee SH, Han KM, Hwang JW, Kim HI, Baek SY. Development and Utilization of KASP Markers for the Identification of Three Types of Ephedra Herbs. Kor. J. Pharmacogn, 2022;53(4):226-33.
3. Lee GS. The Anatomical Identification-key of Ephedrae Herba and its adulterant. Kor. J. Herbol, 2019;34(6):25-32.
4. Ha TH, Kwon TW, Kim YK. Effects of Ephedra Herba ethyl-acetate fraction on high fat diet induced hyperlipidemic mice. Journal of Society of Preventive Korean Medicine 2014;18(2):101-13.
5. Kim HJ, Kim EJ, Han YH. The Effect of Ephedra sinica Pharmacopuncture on Lipid Metabolism in an Experimental Mouse Model of Obesity. J. Int. Korean Med. 2016;37(4):579-90.
6. Jeong JJ, Kim BW. The Effect of Ephedrae Herba Pharmacopuncture on Adipocyte Metabolism. Korean J. Orient. int. Med. 2008;29(1):80-9.
7. Won CW, Jung YS, Yoon KH, Lee HY, Yoon MC, Kim BK, Park SD, Shin SS. Herba Ephedrae and Rhizoma Amorphophalli modulates visceral obesity in micro-CT of high fat induced obese male mice. Herb. Formula Sci. 2008;16(2):205-17.
8. Oh MJ, Lee CH, Kim HJ, Kim HR, Kim MS, Lee DY, Oh CH, Kim MS, Kim JS. The comparative studies on anti-obesity effects of Ephedrae Herba and Cyperi rhizoma in high fat diet fed mice. Herb. Formula Sci. 2016;24(2):108-23.
9. Jo EH, Jo IJ, Park SJ, Jo SH, Park MC. Effects of Ephedra sinica (ES) Extract on the Ovalbumin-Induced Allergic Asthma in Mice. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2014;27(3):84-95.
10. Ryu HC, Shin JG. A study on proper dosage of Ma-huang. J of KMediACS. 2013;5(1):101-11.
11. Lee TH, Hsing LC, Yang CS, Kim LH, Seo ES, Jang IS. Adverse Effects of Ephedra According to Sasang Typology in Healthy Adults : A Double-Blind Randomized Controlled Trial. Korean J. Orient.

- Int. Med. 2009;30(1):144-52.
12. Kim JR, Yun SJ, Lee YK, Lee HJ, Kim JS. A Review on Safety of Herbal Medicines for Doping. *J Korean Med*. 2019;40(3):139-76.
 13. Jo GW, Ok JM, Kim SY, Lim YW. Review on the Efficacy and Safety of Mahuang and Ephedrine in the Treatment of Obesity -Focused on RCT-. *J Korean Med*. 2017;38(3):170-84.
 14. Chang MS, Shim KJ, Oh JH, Yoon JW, Choi MJ, Kim DR, Yang WM, Lim HH, Lee MJ, Park SK. Acute Oral Toxicity of Ephedrae Herba in SD Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2008;22(4):762-75.
 15. Choi DG, Shim KJ, Choi BJ, Park SY, Chang MS, Park SK. Subacute Oral Toxicity of Ephedrae Herba Extract in SD Rats. *Kor. J. Herbology* 2008; 23(4):1-7.
 16. Yoo JH, Park SM, Jung DH, Kim SC. Ephedra has anti-fibrogenic effects by inhibiting the TGF β /Smad pathway in LX-2 cells. *Herb. Formula Sci*. 2024;32(2):141-53.
 17. Aghemo A, Alekseeva OP, Angelico F, Bakulin IG, Bakulina NV, Bordin D, Bueverov AO, Drapkina OM, Gillissen A, Kagarmanova EM, Korochanskaya NV, Kucheryavii UA, Lazebnik LB, Livzan MA, Maev IV, Martynov AI, Osipenko MF, Sas EI, Starodubova A, Uspensky YP, Vinnitskaya EV, Yakovenko EP, Yakovlev AA. Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review. *Ann Med*. 2022;54(1): 1548-60.
 18. Zhao XA, Chen GM, Liu Y, Chen YX, Wu HY, Chen J, Xiong YL, Tian C, Wang GY, Jia B, Xia J, Wang J, Yan XM, Zhang ZP, Huang R, Wu C. Inhibitory effect of silymarin on CCl₄-induced liver fibrosis by reducing Ly6C(hi) monocytes infiltration. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(12):11941-51.
 19. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 2001; 61(14):2035-63.
 20. Gillissen A, Schmidt HH. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther*. 2020;37(4):1279-301.
 21. Balta C, Herman H, Boldura OM, Gasca I, Rosu M, Ardelean A, Hermenean A. Chrysin attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF- β /Smad signaling pathway. *Chem Biol Interact*. 2015;240:94-101.
 22. Bai Y, Wang L, TingYang, Wang L, Ge W. Silymarin ameliorates peritoneal fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2023;396(10): 2379-91
 23. Eraky SM, El-Mesery M, El-Karef A, Eissa LA, El-Gayar AM. Silymarin and caffeine combination ameliorates experimentally-induced hepatic fibrosis through down-regulation of LPAR1 expression. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:49-57.
 24. Sokar SS, El-Sayad ME, Ghoneim ME, Shebl AM. Combination of Sitagliptin and Silymarin ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:98-107.
 25. Okda TM, Abd-Alhaseeb MM, Barka K, Ragab NM. Ginger potentiates the effects of silymarin on liver fibrosis induced by CCL₄: the role of galectin-8. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(2):885-91.
 26. Lee JA, Shin MR, Choi J, Kim M, Park HJ, Roh SS. Co-Treatments of Gardeniae Fructus and Silymarin Ameliorates Excessive Oxidative Stress-Driven Liver Fibrosis by Regulation of Hepatic Sirtuin1 Activities Using Thioacetamide-Induced Mice Model. *Antioxidants (Basel)*. 2022;12(1):97.
 27. Kim WH, Choi DY. *Jangbubyeonjeungnonchi* <7th Ed>. Seoul:Seongbosa, 2004:153-166.
 28. Byun SH, Park SM, Kim SC, Cho IJ. Anti-fibrotic Effect of Mori Folium Extract in Hepatic Stellate Cells. *Kor. J. Herbology*. 2013;28(4):49-55.
 29. Kutz SM, Hordines J, McKeown-Longo PJ, Higgins PJ. TGF- β 1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion. *J Cell Sci*. 2001;114:3905-14
 30. Allen RR, Higgins PJ. Plasminogen activator inhibitor type-1 expression and the pathophysiology of TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Recent Res Devel Physiol*. 2004;2:355-66.
 31. Desmouliere A, Geiniz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -Smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993;122:103-11.
 32. Chung JY, Chan MK, Li JS, Chan AS, Tang PC, Leung K, To K, Lan H, Tang PM. TGF- β Signaling: From Tissue Fibrosis to Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7575.
 33. Lee SI. *Herbology*. Seoul:Suseowon, 1981:189-90.
 34. Zhai HQ, Zhang SF, Gao MC, Liu Y, Ou M, Meng FY, Wang YY. Effects of Herba Ephedra Sinicae and Fructus Schisandrae Chinensis on pathology of rats with bleomycin A(5)-induced idiopathic pulmonary fibrosis. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2011;9(5):553-7.
 35. Kim KH, Kang GH, Lee YU, Kang S, Ji SH, Song JH, Kim CH, Lee SK. Treating COVID-19 with Qingfei Paidu Decoction with and without Ephedra

- Herba: A Retrospective Case Series. *J. Int. Korean Med.* 2022;43(2):264–73.
36. Yoon KH, Lee HY, Jung YS, Seo BI, Park GY, Yoon MC, Shin SS. Modulation of obesity by Gyeongshingangjeehwan18 in ob/ob mice. *Kor. J. Herbology* 2010;25(3):1–9.
 37. Lee HY, Yoon KH, Seo BI, Park GY, Yoon MC, Shen ZB, Cui HH, Shin SS. Molecular biologic mechanism of obesity by GGE_x18. *Kor. J. Herbology* 2011; 26(1):65–74.
 38. Kim HJ, Kim JB. Effects of Mahwangimun-tang in Cholesterol Diet and Triton WR-1339-induced Hyperlipidemic Rat. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2010;24(1):102–10.
 39. Ki YB, Kim DH, Kang DH, Kim SJ, Choi JB, Yang MS. Effect of Mixed Extract of Ephedrae Sinica and Fibrosus Gypsum on Differentiation of Preadipocytes and Obesity of Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2014;24(3):11–27.
 40. Kang HJ, Ku TH, Kim GC. Hemodynamic Effects of Herbal Prescription Containing Ephedra on Weight Loss: A 3-Dimensional Radial Pulse Tonometry Device Study. *J Korean Med Obes Res.* 2023;23(1):28–41.
 41. Park JE, Hwang HS, Kim TY. Studies on Anti-inflammatory Effects of Mahwanghangingamchosukgo-tang Extracts. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2020;34(6):319–25.
 42. Jang HK, Heo DS. Anti-OsteoArthritic effects of Mahwangbuja-tang(Mahuangfuzi-tang) on Papain-Induced Osteo Arthritic mice model. *J Oriental Rehab Med.* 2012;22(4):59–77.
 43. Bae JY, Jo EH, Kim HY, Park MC. Inhibitory Effect of Ten Kinds of Herbal Medicine Including Ephedrae Herba on Nitric Oxide in LPS-induced Murine Peritoneal Macrophage. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* 2009;22(2):19–38.
 44. Wang H, Sun R, Yang S, Ma X, Yu C. Association between serum ferritin level and the various stages of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:934989.
 45. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2014;383(9930):1749–61.
 46. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115:209–18.
 47. Fabregat I, Caballero-Díaz D. Transforming Growth Factor- β -Induced Cell Plasticity in Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Front Oncol.* 2018;8: 357.
 48. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):181–94.
 49. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol.* 2013;3: 1473–92.
 50. Ren Y, Chen Y, Tang EH, Hu Y, Niu B, Liang H, Xi C, Zhao F, Cao Z. Arbidol attenuates liver fibrosis and activation of hepatic stellate cells by blocking TGF- β 1 signaling. *Eur J Pharmacol.* 2024;967:176367.
 51. Huang SJ, Chen SQ, Lin Y, Yang HY, Ran J, Yan FF, Huang M, Liu XL, Hong LC, Zhang XD. Maternal nicotine exposure aggravates metabolic associated fatty liver disease via PI3K/Akt signaling in adult offspring mice. *Liver Int.* 2021;41(8):1867–78.
 52. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker N. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. *Cells.* 2019;8(11):1419.
 53. Chen G, Xia B, Fu Q, Huang X, Wang F, Chen Z, Lv Y. Matrix Mechanics as Regulatory Factors and Therapeutic Targets in Hepatic Fibrosis. *Int J Biol Sci.* 2019;15(12):2509–21.