



Original Article / 원저

麻黃 열수 추출물의 TGF- β /Smad 경로 억제를 통한 간섬유화 억제효능

유재현¹, 박상미¹, 정대화², 김상찬^{1*}

¹대구한의대학교 한의과대학, ²대구한의대학교 제약공학과

Ephedra has anti-fibrogenic effects by inhibiting the TGF- β /Smad pathway in LX-2 cells

Jea Hyun Yoo¹, Sang Mi Park¹, Dae Hwa Jung², Sang Chan Kim^{1*}

¹College of Korean Medicine,

²Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objective : Ephedrae Herba (Ephedra) has been frequently used in the East Asian traditional medicine including Korea, China and Japan in the clinical treatment of asthma, cold and influenza etc. This study was performed to explore an anti-fibrogenic potential of Ephedra Herba water extract (EHE) using immortalized human hepatic stellate cell line, LX-2 cells.

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

Results : Treatment of EHE 30 μ g/ml did not show any cytotoxicity on LX-2 cells. Pre-treatment of EHE (30 μ g/mL) significantly inhibited α -smooth muscle actin expression induced by TGF- β 1. Additionally, EHE significantly decreased Smad2 and Smad3 phosphorylations, Smad binding element-driven luciferase activity and plasminogen activator inhibitor type 1 expression by TGF- β 1. Furthermore, increases of matrix metalloproteinases 2 genes by TGF- β 1 was also attenuated by EHE treatment.

Conclusion : These results suggest that EHE has an ability to suppress fibrogenic process in activated HSC via inhibition of TGF- β 1-TGFBR mediated canonical (Smad dependent) pathway.

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

I. 서론

麻黃(Ephedrae Herba)은 麻黃과에 속한 다년생 초본인 麻黃의 全草를 건조한 것으로, 辛苦溫하며, 肺膀胱心大腸으로 入하며, 發汗解表, 祛營中寒邪, 疏通氣血, 利九竅, 開毛孔하는 효능으로 傷寒, 惡寒無汗, 咳逆上氣, 痰哮氣喘, 皮膚不仁, 水腫風腫 등을 치료한다¹⁾. 그러므로 麻黃은 <東醫寶鑑>에서 咳嗽, 寒, 風의 方劑에 다수 배합되어 활용되었다²⁾.

麻黃에 대한 연구로는 麻黃의 감별연구^{3,4)}, 麻黃과 지질대사에 관한 연구⁵⁻⁷⁾, 麻黃과 비만에 관한 연구^{8,9)}, 麻黃과 천식에 대한 연구¹⁰⁾, 麻黃의 적정 용량에 대한 연구¹¹⁾, 麻黃과 체질에 관한 연구¹²⁾, 麻黃과 관련된 方劑의 연구^{2,13)} 등이 보고되어 있으며, 麻黃이 배합된 方劑에 대한 연구로는 麻黃湯과 급성 신질환¹⁴⁾ 麻黃附子湯合腎着湯과 당뇨병성 신장질환¹⁵⁾, 減肥丸과 심혈관계¹⁶⁾, 麻黃과 五味子 배합의 폐동맥손상¹⁷⁾ 및 천식¹⁸⁾, 輕身降脂丸¹⁸⁾과 비만조절¹⁹⁾ 및 비만조절 기전에 대한 연구²⁰⁾, 麻黃二門湯과 고지혈²¹⁾, 淸肺排毒湯 및 淸肺排毒湯祛麻黃과 COVID-19 증상 개선²²⁾, 補中益氣湯加味方-麻黃辛芍散 병용과 알레르기 비염²³⁾, 麻黃杏仁甘草石膏湯과 항염증²⁴⁾, 麻黃附子湯과 골관절염²⁵⁾, 麻黃, 人蔘, 澤瀉 복합추출물과 인슐린저항성²⁶⁾, 麻黃, 石膏 혼합물과 비만²⁷⁾, 桂枝麻黃各半湯과 특발성 콜린성 두드러기²⁸⁾, 麻黃이 配伍된 10種 처방과 nitric oxide 억제 효과²⁹⁾ 등이 보고되었다. 또한 麻黃과 관련된 안전성에 관한 연구로는 도핑 안전성³⁰⁾, 비만 치료에서 麻黃 및 에페드린의 안전성³¹⁾, SD계 흰쥐를 사용한 麻黃 추출물의 급성 경구투여 독성 시험 연구³²⁾, SD계 흰쥐에서 麻黃 추출물의 아급성 경구 독성 시험 연구³³⁾ 등이 보고되었다. 그러나 麻黃과 간섬유화에 관한 연구는 국내외에서 아직 발표된 바가 없다.

간섬유화에는 간성상세포 (hepatic stellate cell; HSC)가 핵심적 역할을 하며, HSC가 활성화되면 α -smooth muscle actin (α -SMA)과 같은 유전자의 발현을 수반하여 세포외기질의 침착 및 matrix stiffness의 증가로 이어진다³⁴⁾. HSC의 활성화와 가장 관련성이 큰 인자는 TGF- β 1으로, 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^{35,36)}.

본 실험실에서는 <臟腑辨證論治>³⁷⁾의 '肝膽病의 治療 및 常用藥物'에서 제시된 약재 및 '肝病의 證治'에 제시된 方劑의 구성약재 등 130여종의 약재를 선별 및 열수 추출하여, TGF- β 1으로 활성화된 LX-2 세포에서 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)을 western blot으로 스크리닝하였다. 즉, TGF- β 1으로 활성화된 LX-2 세포의 PAI-1발현 대비 PAI-1 감소율이 0-20%인 경우 (+), 20-40%는 (++) , 40-60%는 (+++), 60이상 감소는 (++++)로 평가하였다. 그 결과 麻黃을 포함한 9개의 약재가 (++++)을 나타내었다.

본 연구에서는 위의 스크리닝 결과를 기초로 하여 麻黃의 간섬유화 예방 및 치료 효능을 평가하기 위하여, 간섬유화에서 핵심적 역할을 하는 간성상세포주에 麻黃 물추출물을 전처리한 후, TGF- β 1으로 유도된 섬유화 관련단백질의 발현을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Williams' media E, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, L-glutamine은 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-phospho-Smad3 (p-Smad3) 및 anti-Smad2/3 항체와 horseradish peroxidase가 결합된 이차 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), anti- α smooth muscle actin (α -SMA) 항체, anti- β -actin 항체 및 기타 시약류는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

*Corresponding author: Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1263, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : April 5, 2024 / Revised : May 19, 2024 / Accepted : May 23, 2024



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

麻黃은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하였고, 麻黃 100 g에 물 1.2 L를 넣고 열수 추출하였다. 300 mm filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 여과한 후 여과액을 회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 농축액을 Ultra-low temperature freezer (Operon, Korea)에 동결하여 동결건조기 (LABCONCO, MO, USA)로 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 사용하였다.

3. 세포배양

세포배양은 이전의 연구방법³⁸⁾과 동일하게 진행하였다. 즉, LX-2 세포 (HSC; human Hepatic Stellate cell)는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine을 포함한 DMEM에서 배양하였으며, t-HSC/Cl6 세포는 FBS, 항생제 및 L-glutamine이 포함된 Williams' media E를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. LX-2 세포는 배양 dish 바닥면적의 80% 이상 성장하였을 때 FBS가 포함되지 않은 배지로 교환하여 5시간 동안 추가 배양한 후, 1-100 μ g/mL의 EHE, 5 ng/mL의 TGF- β 1을 실험 목적에 따라 처치하였다.

4. 세포생존율 측정

LX-2 세포를 8×10^4 cells/well로 분주하여 1-100 μ g/mL의 EHE를 24시간 동안 처치한 후 0.5 mg/mL의 MTT 용액과 2시간 반응시켰다. 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

약물 처치 후 수거한 LX-2 세포는 radioimmunoprecipitation buffer와 Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail

(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 혼합한 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시키고 15,000 \times g에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 전세포 추출액 (whole cell lysates)을 제조하였다. 전세포 추출액은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific)를 사용하여 단백질 함량을 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 AmershamTM Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)를 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 약물을 처치한 후 세포를 passive lysis buffer (Promega)로 용해하였다. Luciferase Reporter Assay SystemTM kit (Promega)를 이용하여 luciferase 활성을 측정하고 단백질 농도로 보정하였다.

7. real-time PCR 분석

실시간 PCR 분석은 이전의 연구방법³⁸⁾과 동일한 방법으로, 약물 처치 후 수거한 LX-2 세포로부터 TRIzol reagent (Thermo Scientific)를 이용하여 total RNA를 분리하였고 total RNA (2 μ g)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 사용하여 수행하였다. 분석에 사용한 Primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하였고 table 1과 같다. 유전자의 상대 정량은 GAPDH 유전자의 발현량을 기준으로 2^{-DDCT} 법에 의해 분석하였다.

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'-GCCACTTGTCGGCGATAAGG-3'
GAPDH	Sense	5'-GAAGGTGAAGTCCGGAGTC-3'
	Antisense	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

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 $P < 0.01$ 로 하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. EHE가 세포생존율에 미치는 영향

먼저, 간성상세포주인 LX-2 세포에서 EHE의 세포독성을 평가하였다. EHE를 1-100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 처치한 후 MTT assay를 통하여 세포생존율을 측정하였다. LX-2 세포에 24시간 동안의 EHE 1-30 $\mu\text{g/mL}$ 을 처치한 경우는 control군에 비하여 유의한 세포생존율의 변화를 나타내지 않았고, EHE 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처치한 경우는 control (100.00 ± 3.52%) 대비 81.47 ± 7.52%로 유의한 세포독성을 나타내었다. 그러므로 이후의 실험은 EHE가 세포독성을 나타내지 않는 30 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 간섬유화 억제효과를 평가하였다.

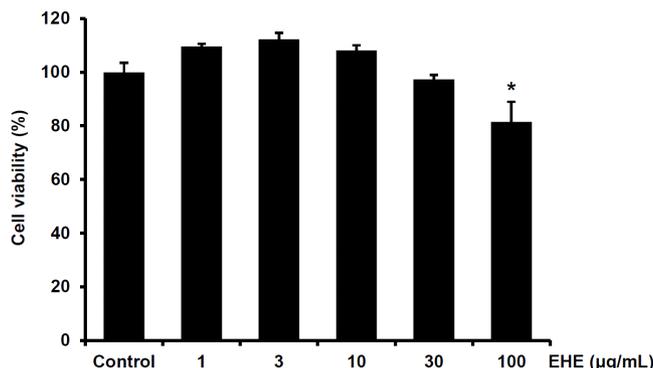


Fig. 1. Effect of Ephedrae Herba water extract (EHE) on LX-2 cell viability.

A Relative cell viability was assessed by MTT assay. LX-2 cells were serum-starved for 5 h and incubated with different concentrations of EHE (1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. Data represent mean ± SD of three independent experiments (Significant as compared to control, * $p < 0.05$; cell viability of LX-2 cells = 100%).

2. EHE가 Smad의 인산화에 미치는 영향

일반적으로 활성 TGF- β 1은 TGF- β 수용체 (TGF- β RII, TGF- β RI)와 결합하여 Smad2와

Smad3를 인산화하고, 인산화된 Smad2/3는 핵으로 전위하여 섬유화 관련 유전자의 전사를 유도하고, 세포외기질 (ECM; extracellular matrix)을 축적한다³⁹⁾.

본 연구에서 p-Smad2의 발현은 TGF- β 1 처치군에서는 control (1.00 ± 0.34) 대비 5.93 ± 0.11 배로 유의하게 증가하였으며, EHE 30 $\mu\text{g/mL}$ 군은 3.82 ± 0.84 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE 30 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리군은 1.04 ± 0.65 배로 유의성을 나타내지 않았다 (Fig. 2A and B).

p-Smad3의 발현은 TGF- β 1처치군에서는 5.49 ± 0.49 배로 control (1.00 ± 0.62) 대비 유의하게 증가하였으며, EHE 30 $\mu\text{g/mL}$ 군은 3.43 ± 0.91 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE 30 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리군은 0.59 ± 0.34 배로 유의한 증가를 나타내지 않았다 (Fig. 2A and C).

TGF- β 1에 의해 핵으로 전위된 p-Smads의 표적 유전자 발현능을 나타낼 수 있는 Smad 결합영역 (SBE) promoter로 조절되는 luciferase를 안정적으로 발현하는 *t*-HSC/C16 세포에 EHE 및 TGF- β 1을 처치한 후 luciferase 활성을 측정하였다. TGF- β 1처치군에서는 12.45 ± 0.16 배로 control (1.00 ± 0.11) 대비 luciferase 활성이 유의하게 증가하였으며, EHE 10, 30 $\mu\text{g/mL}$ 군은 각각 10.91 ± 0.67 , 7.92 ± 0.85 배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE 30 $\mu\text{g/mL}$ 단독처리군은 2.37 ± 0.39 배로 증가를 나타내었다 (Fig. 2D).

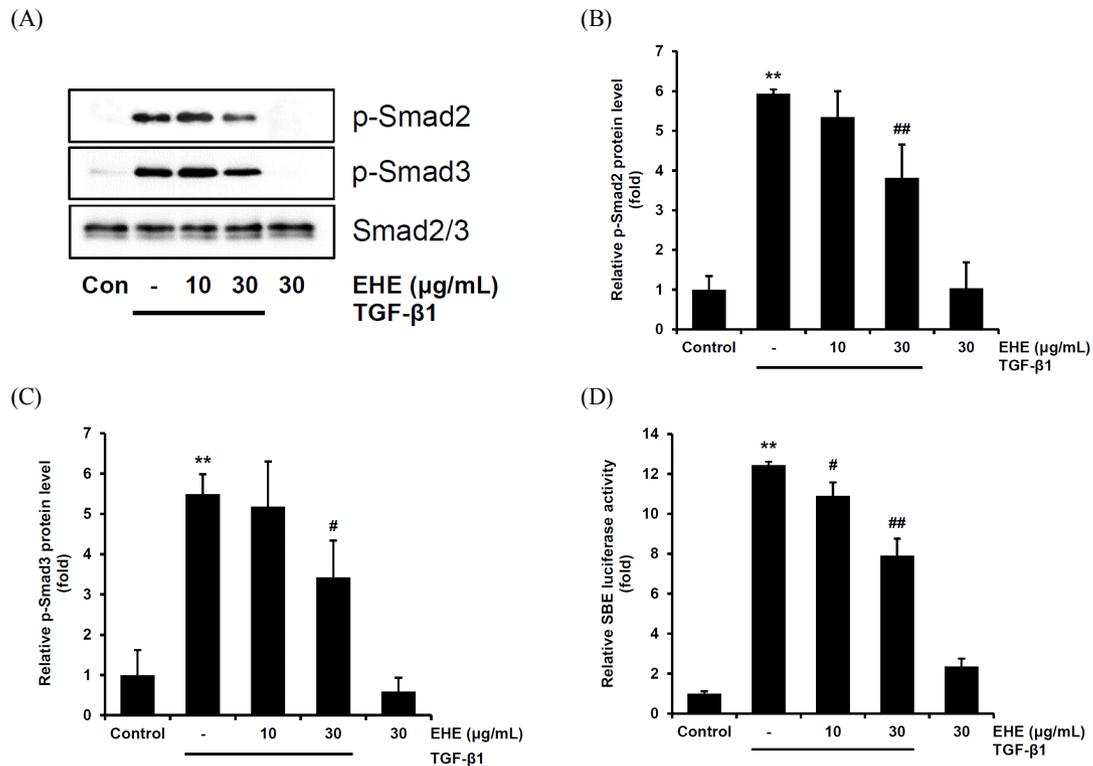


Fig. 2 Inhibitory effect of EHE on TGF- β 1/Smad pathway.

A) The levels of TGF- β 1 induced Smad phosphorylations were analyzed by western blot. Serum-starved LX-2 cells were pre-treated with indicated concentrations of EHE (10, 30 $\mu\text{g/mL}$) for 1 h, then stimulated with the 5 ng/mL of TGF- β 1 for 1 h. Whole cell lysates were blotted. Smad2/3 was used as a loading control. B) and C) The relative expression of p-Smad2 and p-Smad3 were quantified by densitometry scan. D) Recombinant *t*-HSC/C16 cells which express pGL4.48 were incubated without or with different concentrations of EHE for 1 h followed by stimulation with 5 ng/mL of TGF- β 1 for 24 h. Relative luciferase activity compared with that in the controls is shown. 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 without EHE).

3. EHE가 PAI-1의 발현에 미치는 영향

TGF- β 1/Smad 경로의 활성화는 섬유화와 관련된 유전자의 전사를 조절하며, TGF- β 1의 주요 표적 유전자인 PAI-1은 만성 섬유화 질환의 주요 원인인자이다^{40,41}.

EHE가 TGF- β 1 표적 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해 PAI-1의 단백질 및 mRNA 수준을 분석하였다.

PAI-1 단백질의 발현은 TGF- β 1 처치군에서는 10.63 ± 0.85 배로 control (1.00 ± 0.22) 대비 유의하게

증가하였으며, EHE 30 μ g/mL 군은 6.09 ± 0.48 배로 TGF- β 1 처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE 30 μ g/mL 단독처리군은 0.93 ± 0.25 배로 유의한 증가를 나타내지 않았다(Fig. 3A).

PAI-1 mRNA의 발현은 TGF- β 1 처치군에서는 45.22 ± 5.89 배로 control (1.00 ± 0.25) 대비 유의하게 증가하였으며, EHE 10, 30 μ g/mL 군은 각각 8.28 ± 3.69 , 1.33 ± 1.04 배로 TGF- β 1 처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE 30 μ g/mL 단독처리군은 0.44 ± 0.17 배로 유의한 증가를 나타내지 않았다(Fig. 3B).

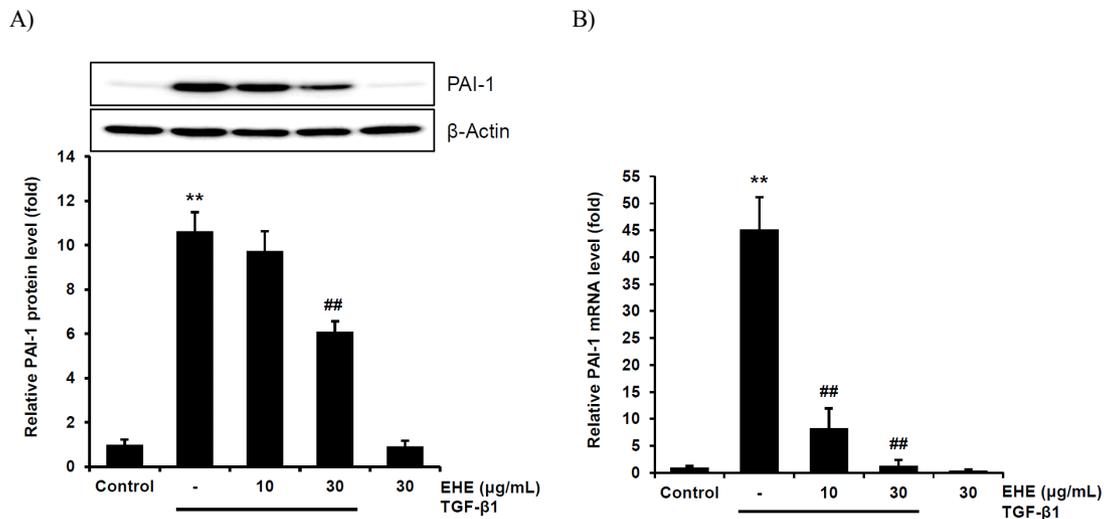


Fig. 3. Effect of EHE on TGF- β 1-stimulated PAI-1 expression.

LX-2 cells were pre-treated with indicated concentrations of EHE (10, 30 μ g/mL) for 1 h, then stimulated with the 5 ng/mL of TGF- β 1 for (A) 24 h, (B) 6 h. A The expression of TGF- β 1-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. (B) PAI-1 mRNA expression in the cells was measured using real-time quantitative RT-PCR. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. (** $p < 0.01$ compared with control cells; ## $p < 0.01$, compared with TGF- β 1 treated cells without EHE)

4. EHE가 α -SMA의 발현에 미치는 영향

TGF- β 1은 인간 HSC에서 α -SMA 발현을 유도하므로⁴², TGF- β 1으로 자극된 α -SMA 발현에 대한 EHE의 효과를 살펴보았다.

Western blotting 결과, α -SMA의 발현은 TGF- β 1

처치군에서는 9.69 ± 0.78 배로 control (1.00 ± 0.16) 대비 유의하게 증가하였으며, EHE 30 μ g/mL 군은 5.53 ± 0.55 배로 TGF- β 1 처치군 대비 유의한 감소를 나타내었다. EHE 30 μ g/mL 단독처리군은 1.15 ± 0.37 배로 유의한 증가를 나타내지 않았다(Fig. 4).

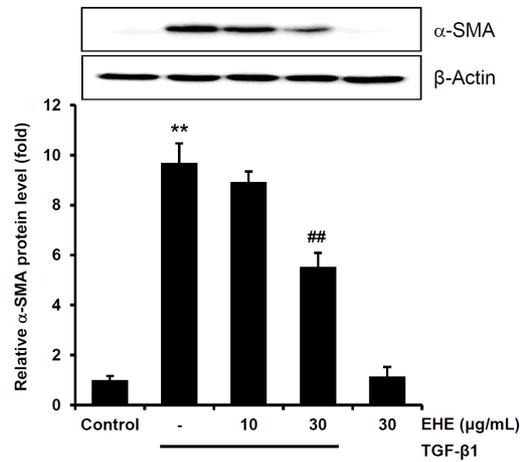


Fig. 4. Effect of EHE on TGF- β 1-induced α -SMA expression.

The expression of TGF- β 1-stimulated α -SMA was analyzed by western blot. Serum-starved cells were incubated in the presence of EHE at concentrations (10, 30 μ g/mL) for 1 h, then treated with 5 ng/mL of TGF- β 1 for 24 h. β -actin was used as a loading control. Data represent the means \pm SD of three independent experiments (** p < 0.01 compared with control cells; ## p < 0.01 compared with TGF- β 1 treated cells without EHE)

5. EHE가 MMPs의 발현에 미치는 영향

MMP2와 MMP9은 간섬유화에서 증가되며⁴³⁾, TGF- β 1, IL-1 β 및 TNF- α 에 의해 증가된다⁴⁴⁾. EHE가 TGF- β 1 표적 유전자중의 하나인 MMP의 발현에 미치는 효과를 실시간 PCR로 분석하였다.

MMP2 mRNA의 발현은 TGF- β 1처치군에서는 3.63 \pm 0.35배로 control (1.00 \pm 0.12) 대비 유의하게 증가하였으며, EHE 10, 30 μ g/mL군은 각각 1.15 \pm 0.59, 0.15 \pm 0.07배로 TGF- β 1처치군 대비 유의한

감소를 나타내었다. EHE 30 μ g/mL 단독처리군은 0.04 \pm 0.02배로 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 5A). MMP9 mRNA의 발현은 TGF- β 1처치군에서는 1.41 \pm 1.47배로 증가하였으나, control (1.00 \pm 1.11) 대비 유의성이 없었으며, EHE 10, 30 μ g/mL군은 각각 0.41 \pm 0.39, 0.11 \pm 0.12배로 TGF- β 1처치군 대비 감소경향을 나타내었으나, 유의성이 없었으며, EHE 30 μ g/mL 단독처리군은 0.10 \pm 0.09배로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5B).

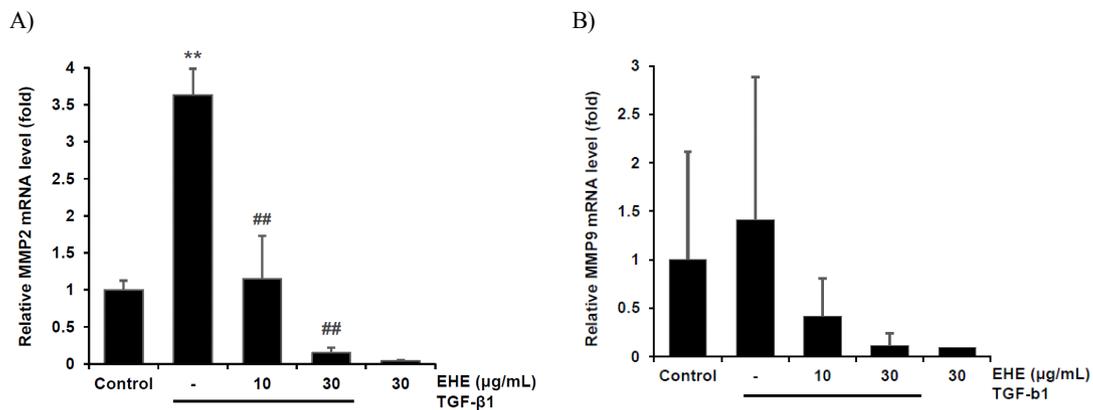


Fig. 5. Inhibitory effect of EHE on the TGF- β 1-induced MMP2 and 9 gene expressions.

LX-2 cells were pre-treated with indicated concentrations of EHE (10, 30 μ g/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 expression of (A) MMP2 and (B) MMP9. All data represent the means \pm SD of three independent experiments (** p < 0.01 compared with control cells; ## p < 0.01 compared with TGF- β 1 treated cells without EHE)

IV. 고찰

麻黃(Ephedrae Herba)은 發汗, 祛寒, 化痰, 利水之品으로¹⁾ 주로 肺의 宣發과 肅降의 기능을 개선시킨다. 현재까지 麻黃에 대한 연구로는 주로 호흡기 질환에 대한 연구^{10,17,22)}, 지질대사 및 비만에 관한 연구^{5-9,16,19-21,27)}, 麻黃과 체질에 관한 연구¹²⁾, 항염증 연구^{24,25,29)}, 안전성 연구³⁰⁻³³⁾, 적정 용량에 대한 연구¹¹⁾가 이루어져 왔으며, 간과 관련한 연구는 극히 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 본 연구실의 스크리닝 결과를 기반으로 麻黃 물추출물이 활성화된 간성상세포에서의 항섬유화를 나타내는지를 평가하였다.

간 질환은 심각한 건강 문제로 전 세계적으로 매년 거의 200만 명이 사망하는 원인이며 이는 간경화와 관련이 있다⁴⁵⁾. 급성 간손상과는 달리 만성 간손상은 주로 간 조직의 반복적인 파괴와 재생과 관련이 있으며, 이는 가장 진행된 (그리고 비가역적인) 섬유화 단계이다. 대부분의 만성 간질환은 진행성 간섬유화를 초래할 수 있다. 간섬유화는 만성 간질환으로, 반복적인 간 손상 및 손상의 회복과 재생과정에서 fibrillar collagen이 풍부한 ECM 단백질이 다량으로 축적되어 발생한다^{46,47)}. 간 손상이 발생하면, 괴사성 및 세포사멸성 간세포를 대체하기 위한 회복 메커니즘이 개시되어 간 재생에 필수적인 상처 치유 및 염증 반응이 생성된다. 그러나, 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, Kupffer cell, endothelial cell, 성상세포 등 다양한 세포가 존재하지만, 간섬유화와 관련된 중심적 세포는 간성상세포 (hepatic stellate cell; HSC)이다. 정상 상태의 간에서 HSC는 ECM의 항상성 유지, 간의 정상적 발달, retinoid 대사, 약물대사 및 해독, 간실질세포의 mass 유지, 혈관의 tension 조절 등의 역할을 한다⁴⁹⁾. 그러나 HSC가 활성화되면 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 이어진다^{34,49,50)}.

HSC의 활성화는 다양한 원인으로 발생할 수 있는데, 과도한 음주, HCV 감염, cholestasis, 대사증후군 등에서 발생할 수 있다. 즉, 간실질세포 손상으로 인한 자유기 및 TGF- β 1, TNF- α , FGF, IGF 등이 HSC의 활성화를 유도할 수 있으며, 또한 Kupffer cell 및 T-cell에서 분비되는 자유기, IL-6, IFN- γ , TGF- β 1, TNF- α , IGF, 담낭세포에서 분비되는 TNF- α , endothelin-1, PDGF 등도 HSC의 활성화를 유도할 수 있다⁴⁶⁾.

그러나, 이중 간섬유화에 있어 가장 관련성이 큰 인자는 TGF- β 1이다. TGF- β 1은 TGF- β 수용체(TGFBR) 매개 canonical pathway와 non-canonical signaling pathway를 통해 quiescent HSC가 α -SMA를 발현하는 activated HSC가 되고 이는 myofibroblast-like cells (근섬유아세포 유사 세포)로 변형 (transdifferentiation)된다³⁴⁻³⁶⁾. TGF- β signaling은 병리적 관점에서 간섬유화뿐만 아니라, kidney, heart, lung 등에서도 섬유화를 개시하는 중심적 역할을 한다³⁹⁾.

일반적으로 활성 TGF- β 는 TGF- β 수용체 type I (TGF- β RI)을 인산화하는 TGF- β 수용체 type II (TGF- β RII)와 결합하는데, Smad dependent 경로는, 활성화된 TGF- β RI는 receptor-associated Smads (R-Smads)인 Smad2과 Smad3의 C-terminal serine residue를 인산화하고, R-Smads는 TGF- β RI 으로부터 분리되어 common Smad (Co-Smad) Smad4와 heterotrimeric complex를 형성하여 핵으로 전위하여 co-activator와 다른 전사인자와 결합하여 섬유화 관련유전자의 전사를 유도한다. 이외에 inhibitory Smad (I-Smad)로 불리는 Smad7은 Smad2/3가 TGF- β RI 과 결합하는 데에 상경적으로 작용하여 TGF- β /Smad signaling에 negative feedback작용을 한다. TGF- β 신호전달에서 Smad independent 경로는 Smad dependent 경로와는 달리 Smad와 상관없이 Rho, PI3K/Akt, Grb2/SOS 신호전달을 포함하고 있다^{39,47)}.

본 연구에서는 麻黃 물추출물이 간성상세포에서의 항섬유화 효능을 TGF- β 신호전달의 Smad dependent 경로를 위주로 연구하였다.

먼저, 간성상세포주인 LX-2 세포에서 EHE의 세포독성을 평가하였으며, EHE 100 μ g/mL을 처치한 경우는 유의한 세포독성을 나타내어, EHE가 세포독성을 나타내지 않는 30 μ g/mL 이하의 농도에서 본 연구를 진행하였다.

일반적으로 활성 TGF- β 1 신호전달은 Smad2와 Smad3를 인산화하고, 인산화된 Smad2/3는 섬유화 관련 유전자의 전사를 유도하고, ECM을 축적한다³⁹⁾. Smad 전사인자의 표적유전자 프로모터 영역의 결합 및 이에 의한 표적 유전자의 발현 조절에는 Smad 분자의 인산화가 수반되며, TGF- β 1 자극에 의해서는 세포 내에서 Smad3와 Smad2 분자가 주로 인산화되는 것으로 보고되었다⁵¹⁾. 본 연구에서도 TGF- β 1에 의해 p-Smad2와 p-Smad3의 발현이 유의하게 증가되었고, 이들은 모두 EHE 30 μ g/mL의 전처치에 의해 유의하게 감소하였다. TGF- β 1/Smad 신호전달에서 Smad 분자의 DNA 결합에 의한 표적 유전자 발현을 지표할 수 있는 Smad 결합영역 (SBE)을 포함한 리포터 유전자를 t-HSC/C16 세포에 도입하여 EHE 및 TGF- β 1을 처치한 후 SBE 리포터 유전자 분석을 수행한 결과, TGF- β 1은 SBE luciferase의 활성을 현저하게 증가시켰고, EHE 전처치는 SBE luciferase 활성을 감소시켰다.

또한, TGF- β 1/Smad 경로의 활성화는 섬유화와 관련된 유전자의 전사를 조절하며, TGF- β 1의 주요 표적 유전자인 Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)은 만성 섬유화 질환의 주요 원인인자이다^{40,41)}. PAI-1은 plasminogen activators (PAs; uPA and tPA)의 주요 생리학적 억제제이며 TGF- β 1의 영향을 받는다⁵²⁾. PAI-1의 수준은 섬유성 질환에서 유의하게 증가하며, 섬유화 진행시 PAI-1은 MMP 활성을 차단하고, 섬유소 용해 (fibrinolysis)의 차단을 통해 fibrin의 축적을 증가시켜 ECM의 분해를 방지하고 섬유화를 촉진하며⁵³⁾, 부분 간 절제술, 저산소증 및 당뇨병을 포함하는 특정 병태생리학적 상황 또는 과정에서도 증가된다⁵⁴⁾. 본 연구 결과서도 EHE 30 μ g/mL 군은 PAI-1 단백질의 발현을 TGF- β 1 처치군 대비 57.3%수준으로 감소시켰으며, PAI-1 mRNA의

발현은 control 수준으로 감소시켰다.

TGF- β 1은 인간 HSC에서 α -SMA 발현을 유도한다⁴²⁾. HSC는 활성화되지 않은 일반적인 경우에는 adipocyte (PPAR- γ , SREBP-1c, leptin 등)의 특성을 나타내지만, 활성화된 경우 myogenic marker 로, α -SMA, c-myb, myocyte enhancer factor-2 등을 나타내므로, α -SMA는 섬유화 마커 중 하나이다^{46,55)}. 간조직에서 α -SMA가 발현되면, 이는 HSC가 활성화되고, 간섬유화가 발생하였음을 의미한다^{56,57)}. 본 연구의 α -SMA 역시 EHE 30 μ g/mL 군에서 유의하게 감소되었다. 이러한 결과는 EHE가 간섬유화의 억제에 유의함을 나타낸다.

활성화된 HSC는 다량의 ECM을 방출하고, ECM은 matrix metalloproteinases (MMPs)에 의하여 degradation된다. 그러나 HSC가 장기적으로 활성화되면 MMPs의 오조절 (dysregulated expression)을 유도하여 결과적으로 과도한 ECM accumulation이 일어난다³⁴⁾.

인간의 MMP는 기질 (substrate) 특이성과 상동성을 기준으로 6종으로 분류된다. 첫 번째는 collagenases 그룹으로 MMP-1, -8, -13가 이에 해당하며, 두 번째는 stromelysins 그룹으로 MMP-3, -10, -11, -17이 있으며, 세 번째로는 gelatinases 그룹으로 MMP-2, -9, 네 번째는 matrilyns 그룹으로 MMP-7, -26이며, 다섯 번째는 membrane-type MMPs 그룹으로 MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25이 해당되며, 여섯 번째는 기타그룹으로 MMP-12, -19, -20, -21, -22, -23 (-23A와 23B), -27, -28이 해당된다^{43,58)}.

이중, 만성 간손상에서 MMP-1, -3, -19는 항섬유화 역할을 하는 것으로 보고되어 있기도 하지만⁵⁸⁾, MMP-2와 MMP-9은 간섬유화에서 증가되는 것으로 보고되고 있으며, MMP-2는 만성바이러스성 간염, 간섬유화, IRI (ischemia and reperfusion injury), 모든 단계의 알콜성 간경화, 담즙폐쇄증, HCC에서 발현이 증가되며, MMP-9은 IRI, 간섬유화, stage C의 알콜성 간경화, HCC에서 발현이 증가되며, 또한 MMP-9은 HSC의 apoptosis를 유도하고, 암의 침습과 전이를 촉진하기도 한다⁴³⁾. 본 연구에서 MMP2 mRNA의 발현은 EHE가 유의하게 감소시켰으나, MMP-9 mRNA의 발현은 EHE가 감소시키는 경향을 나타내었으나, 유의성있는 결과를 나타내지는 않았다. 이러한 결과는 EHE가 TGF- β 1로 활성화된 Smad 의존적 신호전달에서 Smad의 인산화를 억제하여 간의

섬유화를 억제함을 의미한다.

본 연구에서는 TGF- β 1/Smad경로에 대한 EHE의 효능만을 평가한 것이므로 향후, Smad independent 경로 및 *in vivo* 연구를 통하여 EHE의 항섬유화효과에 대하여 좀 더 상세한 연구의 필요성이 있다. 그러나, 본 연구는 적어도 麻黃물추출물이 간성상세포에서 항섬유화효능을 가진다는 최초의 보고로서 그 의미가 있다.

V. 결론

본 연구에서는 마황 열수 추출물 (EHE)이 간성상 세포주 (LX-2)에서 TGF- β 1에 의한 Smad dependent 신호 전달 및 관련유전자 발현조절을 통하여 간섬유화를 억제할 수 있는지를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 마황 열수 추출물은 간성상세포에서 30 μ g/mL 이하의 농도에서는 세포 독성을 나타내지 않았다.
2. 마황 열수 추출물은 간성상세포에서 p-Smad2 및 p-Smad3를 유의하게 억제하였으며, 또한 SBE 리포터 유전자 활성을 유의하게 억제하였다.
3. 마황 열수 추출물은 간성상세포에서 섬유화의 마커인 α -SMA의 발현을 유의하게 억제하였으며, 또한 TGF- β 1의 주요 표적 유전자인 PAI-1을 유의하게 억제하였다.
4. 마황 열수 추출물은 PAI-1 mRNA의 발현 및 MMP-2 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰다.

Acknowledgement

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

References

1. Lee SI. Herbology. Seoul:Suseowon, 1981:189-90.
2. Hwang CH, Yun YG. Study on Application of Herba Ephedrae Main Blended Prescription from Dongeuybogam. The Koran Journal of Oriental Medical Prescription, 2005;13(2):16-92.
3. 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.

4. Lee GS. The Anatomical Identification-key of Ephedrae Herba and its adulterant. Kor. J. Herbol. 2019;34(6):25-32.
5. 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.
6. 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.
7. Jeong JJ, Kim BW. The Effect of Ephedrae Herba Pharmacopuncture on Adipocyte Metabolism. Korean J. Orient. int. Med. 2008;29(1):80-9.
8. 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. The Koran Journal of Oriental Medical Prescription, 2008;16(2):205-17.
9. 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.
10. 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.
11. Ryu HC, Shin JG. A study on proper dosage of Ma-huang. J of KMediACS. 2013;5(1):101-11.
12. 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.
13. Lee TH. Literature investigation on the meaning of Mahwang, Gyeji, Sesin, Buja and Related



- Prescriptions. *Herb. Formula Sci.* 2018;26(3): 261-5.
14. Ming Y, Cheng S, Long W, Wang HL, Xu C, Liu X, Zhang Q, Zhao S, Zou X, Fan J, Wang L, Shen H. The Herbal Formula Granule Prescription Mahuang Decoction Ameliorated Chronic Kidney Disease Which Was Associated with Restoration of Dysbiosis of Intestinal Microbiota in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;4602612.
 15. Dai H, Liu F, Qiu X, Liu W, Dong Z, Jia Y, Feng Z, Liu Z, Zhao Q, Gao Y, Zhang Z, Gao C, Sun S, Tian X, Liu B. Alleviation by Mahuang Fuzi and Shenzhuo Decoction in High Glucose-Induced Podocyte Injury by Inhibiting the Activation of Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway, Resulting in Activation of Podocyte Autophagy. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;7809427.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Zhuo Z, Nie J, Xie B, Wang F, Shi M, Jiang Y, Zhu W. A comprehensive study of Ephedra sinica Stapf-Schisandra chinensis (Turcz.) Baill herb pair on airway protection in asthma. *J Ethnopharmacol.* 2024;322:117614.
 19. 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.
 20. Lee HY, Yoon KH, Seo BI, Park GY, Yoon MC, Shen ZB, Cui HH, Shin SS. Molecular biologic mechanism of obesity by GGEx18. *Kor. J. Herbology* 2011;26(1):65-74.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Yun CS, Hong SH, Park MC, Hwang CY. The Effects of Bojungikgitang-gamibang Administration along with Mahwangshingungsan on the Rat Model with Allergic Rhinitis. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* 2008;21(3):111-23.
 24. Park JE, Hwang HS, Kim TY. Effects of Mahwanghangingamchosukgo-tang Extracts. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2020;34(6):319-25.
 25. Jang HK, Heo DS. Anti-OsteoArthritic effects of Mahwangbuja-tang(Mahuangfuzi-tang) on Papain-Induced OsteoArthritic mice model. *J Oriental Rehab Med.* 2012;22(4):59-77.
 26. Kim KB, Ahn SH. The Efficacy of Ephedra sinica, Panax ginseng, and Alisma orientale Extract on Insulin resistance induced by Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Pediatr Korean Med.* November, 2020;34(4):11-21.
 27. Ki YB, Kim DH, Kang DH, Kim SJ, Choi JB, Yang MS. Effect of Mixed Extract of Ephedrae Sinica and Fibrosium Gypsum on Differentiation of Preadipocytes and Obesity of Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2014;24(3): 11-27.
 28. Kim KS, Kim YB. A Case of Idiopathic Cholinergic Urticaria Associated with Acquired Hypohidrosis by Herbal Medicine Applied Gejimahwanggakban-tang. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* 2009;22(3):220-7.
 29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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):762-5.
33. 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.
34. 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-beta1 signaling. *Eur J Pharmacol.* 2024;967:176367.
35. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker N. TGF-in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells.* 2019;8(11):1419.
36. 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.
37. Kim WH, Choi DY. *Jangbubyeonjeungnonchi* <7th Ed>. Seoul:Seongbosa. 2004:153-66.
38. Kim JK, Han NR, Park SM, Jegal KH, Jung JY, Jung EH, Kim EO, Kim D, Jung DH, Lee JR, Park CA, Ku SK, Cho IJ, Kim SC. Hemistepsin A alleviates liver fibrosis by inducing apoptosis of activated hepatic stellate cells via inhibition of nuclear factor- κ B and Akt. *Food Chem Toxicol.* 2020;135:111044.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Geervliet E, Bansal R. Matrix Metalloproteinases as Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Liver Diseases. *Cells.* 2020;9(5):1212.
44. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood.* 2007;109(9):4055-63.
45. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol.* 2019;70:151-71.
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. 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.
51. Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGF beta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett.* 2001;502:4–10.
52. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* 2012; 227:493–507.
53. Iwaki T, Urano T, Umemura K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *British Journal of Haematology.* 2012;157:291–8.
54. Cho IJ, Kim SH, Kim SG. Inhibition of TGFb1-mediated PAI-1 induction by oltipraz through selective interruption of Smad 3 activation. *Cytokine.* 2006;35:284–94.
55. Boo YC. Therapeutic Potential and Mechanisms of Rosmarinic Acid and the Extracts of Lamiaceae Plants for the Treatment of Fibrosis of Various Organs. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(2):146.
56. Lindert S, Wickert L, Sawitza I, Wiercinska E, Gressner AM, Dooley S, Breitkopf K. Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathways leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2. *Matrix Biol.* 2005;24:198–207.
57. Rong X, Yang Y, Zhang G, Zhang H, Li C, Wang Y. Antler stem cells as a novel stem cell source for reducing liver fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2020;379(1):195–206.
58. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* 2015;44–46:147–56.