

지방산으로 유발된 비알코올지방간질환 실험모델에 미치는 生肝湯加味方の 효과

유재연, 이장훈
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effects of *Saenggantanggami-bang* on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Model Induced by Fatty Acids

Jae-yeon Yoo, Jang-hoon Lee

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effects of *Saenggantanggami-bang* (SG) on nonalcoholic fatty liver disease.

Methods : HepG2 cells were used in an *in vitro* model. HepG2 cells were divided into three groups. The Normal group was incubated with no fatty acid. The Control group was incubated with 1mM palmitic acid to introduce fat overloading. The PA-SG group was incubated with 1mM palmitic acid and various concentrations of *Saenggantanggami-bang* (SG). Cell viability and cytotoxicity were analyzed by MTT assay and LDH assay. Intracellular triglyceride (TG) levels, reactive oxygen species (ROS) levels, ATP amount, and GST activity were measured. Cell death pattern and protective effect of SG on cell death were studied by DNA fragmentation and caspase-3 intensity (western blot).

Results : Compared with the Control group, cell viability of the PA-SG group significantly increased ($P<0.01$), cytotoxicity of the PA-SG group decreased ($P<0.01$), and intracellular TG levels and ROS levels of the PA-SG group decreased ($P<0.05$). In DNA fragmentation assay, necrotic pattern was observed and DNA fragment decreased in the PA-SG group. In western blot, apoptotic pattern was observed, caspase-3 intensity of the PA-SG group was reduced significantly, but there were no significant differences in intracellular ATP amount and GST activity between the control group and the PA-SG group.

Conclusion : The results suggest that *Saenggantanggami-bang* can be a potential candidate for the clinical treatment of nonalcoholic fatty liver disease.

Key words : nonalcoholic fatty liver disease, *Saenggantanggami-bang*, cell viability, cytotoxicity, TG, ROS

1. 서론

비알코올지방간질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올섭취의 남용력이 없는 환자에서

알코올간질환과 유사한 간의 조직학적 손상을 보이는 질환이다. 단순 지방증(steatosis)과 염증이나 섬유화가 진행된 지방간염, 간경변증 등의 간질환을 모두 포함한다^{1,2}.

국내에는 정확한 통계 자료는 없으나, NAFLD와 밀접한 관계가 있다고 알려진 대사증후군의 유병률이 증가 추세에 있어 NAFLD의 유병률도 지속적으로 증가할 것으로 예상된다^{3,4}. NAFLD는 서

· 교신저자: 이장훈 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
Tel: 02-958-9118 Fax: 02-958-9120
E-mail: komclive@khu.ac.kr

구의 경우 전 인구의 15-25%, 비만이나 제2형 당뇨병을 갖고 있는 환자들에서는 유병률이 70-90% 까지 증가하는 것으로 알려져 있다^{5,6}.

최근 NAFLD에 대한 연구와 관련하여 NAFLD와 대사증후군과의 연관성에 관한 연구^{7,8}, NAFLD의 진행기전에 관한 연구^{9,10}, NAFLD 진행의 임상적 예측 인자에 관한 연구^{11,12} 및 각 기전에 관련된 치료약물에 관한 연구¹³ 등 다양한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 체계적인 연구는 부족한 실정이며 구체적으로 효과가 입증된 약물이나 치료법은 아직 없다. NAFLD의 위험인자 교정, 간으로의 지방산 유입 억제, 간세포 보호능력이 있는 약제의 사용 등이 치료의 지침이 되고 있다¹⁴.

한의학적으로는 NAFLD와 관련하여 최근 동물 실험 및 분자생물학적 실험을 통해 한약물의 효능 및 약리기전 연구가 다양하게 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁹.

생간탕가미방은 급만성 간질환과 고지혈증에 효능이 있는 生肝湯에 鬱金, 山查, 丹蔘을 加味한 처방으로, 선행연구에서 고지방식으로 유발된 NAFLD 동물 모델에서 체중, Triglyceride(TG) 및 fat granule을 감소시키고 염증관련 인자인 TNF- α 를 유의성 있게 감소시키는 것으로 확인된 바 있다¹⁹.

이에 저자는 본 연구에서 생간탕가미방의 약리 작용기전을 보다 구체적으로 살펴보고자 분자생물학적인 연구를 실시하였으며, 세포독성 억제 효과, 항산화, 항염증, 세포사에 미치는 영향 등을 살펴보기 위해 MTT assay, LDH assay, 세포내 TG level 측정, ROS level 측정, ATP 정량분석, GST 활성도 측정, DNA fragmentation assay, caspase-3 intensity를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료 및 세포배양

1) 재 료

본 실험에 사용한 약재는 대한약전의 한약규격

집²⁰에 근거하여 경희대 부속 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며 내용 및 용량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Saenggantangi-bang* (SG)

Herb	Scientific Name	Volume(g)
茵 陳	<i>Artemisiae capillaris Herba</i>	40
澤 瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	15
白 朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	12
山 查	<i>Crataegii Fructus</i>	12
白 茯苓	<i>Hoelen</i>	8
豬 苓	<i>Polyporus</i>	8
鬱 金	<i>Curcumae Radix</i>	8
丹 蔘	<i>Salviae Miltiorrhizae</i>	8
枳 實	<i>Ponciri Fructus</i>	6
砂 仁	<i>Amomi Fructus</i>	6
青 皮	<i>Aurantii Immatri Percarpium</i>	6
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
Total amount		135

2) 세포배양

human hepatoma 세포주인 HepG2 cell line을 10%(v/v) fetal bovine serum, 1% PS(penicillin-streptomycin)을 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액으로 10cm 지름의 원형배양 접시에서 37°C, 5% CO₂ 를 유지하고 배양하여 분주하였다.

2. 방 법

1) 검액의 조제

(1) 약제의 추출

① 물 추출

생간탕가미방 약제 1첩(135g)을 2000ml의 round bottomed flask에 넣고 1000ml의 3차 증류수를 더하여 灌流 冷却裝置 하에서 2시간 동안 가열추출하였다. 추출액을 Watmann여과지로 여과한 후 rotary evaporator로 감압 농축하여 농축액을 얻었다.

② 에탄올 추출

생간당가미방 약제 1첩(135g)을 1000ml의 70% 에탄올 수용액으로 4°C에서 냉침 추출하였다. 3시간마다 분광기로 400nm에서 흡광도를 측정하여 변화량이 5%미만으로 둔화되었을 때 추출이 완료된 것으로 간주하였고 48시간이 소요되었다. 추출액을 Watmann여과지로 여과한 후 등근바닥플라스크로 옮겨 회전식 증발기로 감압 농축하였다.

(2) 동결건조

① 물 추출

농축액을 동결건조하여 분말상태의 생간당가미방 21.6g(수득율 16%)을 얻었다.

② 에탄올 추출

농축액의 용매가 제거되기 전에 물을 더하여 얼리고 동결건조하여 분말상태의 생간당가미방 20.4g(수득율 15.1%)을 얻었다.

(3) 얻어진 동결건조 엑기스를 -80°C 냉동고에 보관하고 필요할 때마다 media에 녹여 사용하기 전 0.2 μ m실린지로 여과하여 필요한 농도로 사용하였다.

2) 실험설계

HepG2 cell들은 1) 정상군(The Normal group with no treatment) 2) 대조군(The Control group with Palmitic acid only) 3) Palmitic acid+생간당가미방군(The PA-SG group)의 3군으로 나누고 각 실험마다 실험횟수는 3회로 하였다. 모든 실험에서 세포가 각 well에 분주되고 24시간 후 배양액을 Palmitic acid만 함유된 배양액 및 생간당가미방과 Palmitic acid가 함께 함유된 배양액으로 교환하고 다시 24시간 경과 후 각기 실험법대로 측정하였다.

3) MTT assay(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay)

세포 활성도 측정은 Molecular Probes사(OR, USA)가 제공한 MTT assay를 이용하였다. 세포를 well 당 1×10^5 개의 세포가 되도록 24-well plate에 안착시키고 24시간 후 실험에 사용하였다. 배양액을 필요농도의 palmitic acid가 포함된 1ml의 배양액으로 교체하고 24시간 후 MTT assay를 실시하

였다. 배양액을 제거하고 각 well에 100 μ l의 MTT stock(5mg/ml)을 처리한 후 2시간 동안 알루미늄 포일로 빛을 차단한 상태에서 반응시켰다. 이후 용액을 제거하고 각 well에 500 μ l의 DMSO(dimethylsulfoxide)를 더하여 세포내 형성된 formazan을 용해하고 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader (모델명: VERSARMAX, Molecular Devices(CA, USA))를 이용해 570nm에서 흡광도를 측정하였고 정상군의 흡광도를 100%로 기준하여 상대비율을 구해 cell viability라 정의하였다.

4) LDH assay(lactate dehydrogenase assay)

세포독성 측정은 Roche Applied Science(Mannheim, Germany)에서 제공된 CytoTox96 6(R) Non-Radioactive Cytotoxicity Assay를 사용하였다. 1×10^4 개의 세포를 96-well plate에 안착시켜 24시간 배양하여 각 실험조건에 맞게 처리하였다. 24시간 후 배양액 50 μ l를 Eppendorf 튜브로 옮기고 50 μ l의 물을 더하였다. (+)control군은 배양액을 제거한 well에 10% Tween 20 용액 50 μ l를 사용해 시료를 lysis하고 50 μ l의 물을 더하여 사용하였고, (-)control군은 50 μ l의 DMEM 배양액에 50 μ l의 물을 더하여 사용하였다. 준비된 시료에 100 μ l의 반응시료를 더하여 상온에서 30분간 반응시키고 stop 용액을 더하여 반응을 종결시켰다. ELISA reader를 이용해 490nm에서 흡광도를 측정하였다. cytotoxicity는 다음과 같이 정의하였다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{(\text{시료의 흡광도} - (-)\text{control의 흡광도})}{((+)\text{control의 흡광도} - (-)\text{control의 흡광도})} \times 100$$

5) Triglyceride(TG) 측정

(1) Triglyceride(TG) confocal 실험

준비된 세포를 1ml PBS(phosphate buffered saline)로 간단히 씻은 후 1 μ M의 Nile red 1ml를 포함한 용액을 더하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 15분간 배양했다. 이후 1ml의 PBS로 3번 씻은 후 최소량의 PBS만 남은 상태에서 Carl Zeiss Confocal Microscopy로 형광을 관찰하였다. 이때 excitation wavelength는

488nm로 하였고 emission filter는 phospholipid 특정시 585-610nm bandpass filter, triglyceride 측정시 505-550nm bandpass filter를 각기 사용하였고 phospholipid는 붉은색, triglyceride는 노란색으로 세포영상에 표시하였다.

(2) Triglyceride 정량분석

세포내 Triglyceride의 양은 BioVision사(CA, USA)에서 제공한 Triglyceride Quantification Kit를 사용해 정량하였다. 5×10^5 개의 세포를 6-well plate에 배양하여 실험조건에 따라 처리하고 세포를 회수하였다. 이를 Eppendorf 튜브로 수확하여 0.5ml의 5% Triton-X100을 더하고 100°C에서 5분간 처리한 후 상온으로 천천히 식혔다. 1000g, 5분간 원심분리하여 녹지 않는 물질을 제거하고 물을 더하여 50 μ l로 되게 하였다. 이에 2 μ l의 lipase를 더하고 20분간 상온 처리한 후, 완충용액, 효소가 포함된 준비된 reagent mix 50 μ l를 더하였다. 이 시료를 빛이 차단된 상온에서 1시간 동안 유지한 후 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 triglyceride량은 위에서 얻어진 값을 제공된 표준 triglyceride 값과 비교하여 정하였다.

6) Reactive oxygen species(ROS) 측정

(1) Reactive oxygen species(ROS)의 confocal 실험

준비된 세포를 1ml PBS로 씻은 후 1ml의 carboxyl-H2DCFDA(5-(and-6)-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester)를 포함한 용액을 더해 37°C, 5% CO₂ 조건에서 빛을 차단하고 30분간 배양했다. carboxyl-H2DCFDA의 최종 농도는 10 μ M로 하였다. 이후 1ml의 PBS로 3번 씻은 후 최소량의 PBS만 남은 상태에서 Carl Zeiss Confocal Microscopy로 형광을 관찰하였다. 이때 excitation wavelength는 488nm로 하였고 530nm longpass의 emission filter를 사용하여 ROS는 녹색으로 세포영상에 표시하였다. (+)control은 100 μ M hydrogen peroxide(H₂O₂)로 처리해 37°C에서 1시간 동안 배양한 시료를 사용하였다.

(2) Reactive oxygen species(ROS)의 정량분석
Confocal 실험과 동일하게 준비된 세포를 carboxyl-H2DCFDA로 동일하게 처리하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 Eppendorf 튜브에 수확하여 RIPA(radio immunoprecipitation assay) buffer로 lysis하여 fluorometer로 형광을 측정하였다.

7) Adenosine triphosphate(ATP) 정량분석

BioVision사(CA, USA)에서 제공한 ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 준비된 세포를 200 μ l의 ATP Assay Buffer에 녹이고 15,000g으로 2분간 원심분리하여 녹지 않는 물질은 제거하였다. 상등액 50 μ l를 96-well plate로 옮긴 후 회사에서 제공한 반응용액 50 μ l를 첨가하고 상온에서 빛이 차단된 상태로 30분간 유지하였다. 흡광도는 570 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

8) Glutathione S-Transferase(GST) 활성도 측정

Glutathione S-transferase assay는 Biovision사(CA, USA)에서 제공된 kit를 사용하였다. 24-well plate에 세포를 준비하고 well 당 150 μ l의 sample buffer를 더하여 10,000g으로 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액 100 μ l에 10 μ l의 glutathione, 10 μ l의 CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 용액, 90 μ l의 GST assay 용액을 더하여 반응시켰다. 각 well의 340nm의 흡광도를 분단위로 측정하고 반응속도를 구하였다.

9) DNA fragmentation assay

cell death의 진행양태를 조사하기 위하여 세포의 chromosomal DNA를 분리하여 1.5% agarose gel에 전개하여 DNA fragment의 양태를 확인하였다. Chemicon Internation Inc.(USA)에서 제공한 Apoptotic DNA Ladder Detection Kit를 실험방법에 따라 수행하였다.

10) Western blot(caspase-3 intensity)²¹

6-well plate에 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 용액 20 μ l를 더하였다. 단백질 10 μ g의 sample을 SDS-PAGE를 이용해 분리한 뒤 semi dry type의 blotter를 이용

하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막으로 옮겼다. 이 막을 Tris buffer saline(TBS; 0.2M Tris base, 1.37M NaCl, pH7.6)에 0.1%(v/v) Tween 20을 넣은 용액(TBS-T)에 씻은 후, 5%(w/v) bovine serum albumin (BSA)이 첨가된 같은 용액에 1시간 동안 보관하였다. 이 막을 TBS-T로 5분간 씻어주는 과정을 세 번 실시하여 초과 BSA를 제거한 후, antibody가 포함된 같은 용액에 넣어 실온에서 2시간 동안 보관하였다. 또 TBS-T로 5분간 씻어주는 과정을 5번 반복한 후, secondary antibody를 넣은 BSA 용액에 담구어 실온에서 1시간 동안 보관하였다. 그리고 TBS-T로 5분간 씻는 과정을 3번 반복한 후 ECL substrate를 사용하여 면역반응 밴드를 필름에 노출하고 사진현상을 통하여 확인하였다.

3. 통계처리

각 군들 사이의 비교에는 student t-test를 이용하였고, p < 0.05인 경우를 유의성이 있는 것으로 보았다.

III. 결 과

1. MTT assay 소견

1) fatty acids의 cell viability에 미치는 영향

palmitic acid를 농도별로 처리하여 MTT assay 측정된 결과 palmitic acid가 0.25mM 농도에서는 정상군에 비해 cell viability가 약간의 증가를 보였으나 1mM 농도부터는 정상군에 비해 cell viability가 농도의존적으로 감소되었다(Fig. 1).

2) 생간탕가미방의 cell viability에 미치는 영향

Palmitic acid+생간탕가미방군(The PA-SG group)을 물 추출군(Herb A), 에탄올 추출군(Herb B) 두 군으로 나눠 각각 50, 100, 200, 400, 500µg/ml의 농도로 각기 투여한 결과, 두 군 모두 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)에 비해 50µg/ml부터 400µg/ml사이에서 농도의존적으로 cell viability를 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 2).

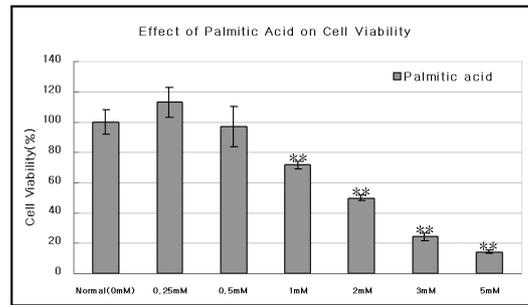


Fig. 1. Effect of palmitic acid on cell viability in HepG2 cell.

The cells were incubated with various concentrations of palmitic acid(0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5mM) for 24h. The cell viability was measured by MTT assay. The cell viability of HepG2 cell was significantly decreased according to the concentration of palmitic acid(** : P<0.01).

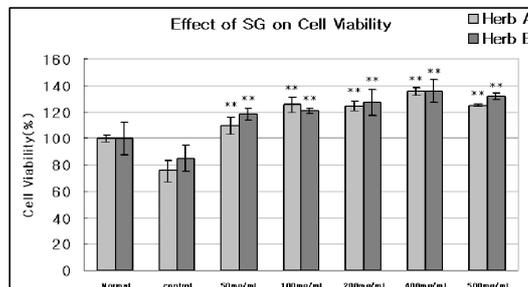


Fig. 2. Effect of SG on cell viability in palmitic acid-treated HepG2 cell.

The normal group was treated with no fatty acid. The control group was treated with 1mM-palmitic acid. The cells were incubated with various concentrations of SG(50, 100, 200, 400, 500µg/ml) in medium containing 1mM-palmitic acid for 24h. The cell viability was measured by MTT assay. Herb A is water extract and Herb B is 70% ethanol extract. Compared with the Control group, the cell viability of the PA-SG group was significantly increased(P<0.01).

2. LDH assay 소견

1) fatty acids의 cytotoxicity에 미치는 영향

palmitic acid를 농도별로 처리하여 LDH assay 측정된 결과 palmitic acid가 0.5mM 농도에서부터

정상군에 비해 cytotoxicity가 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 3).

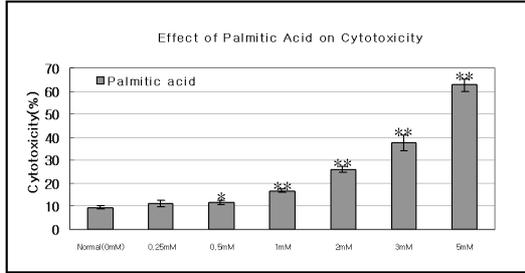


Fig. 3. Effect of palmitic acid on cytotoxicity in HepG2 cell.

The cells were incubated with various concentrations of palmitic acid(0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5mM) for 24h. The cytotoxicity was measured by LDH assay. The cytotoxicity of HepG2 cell was significantly increased according to the concentration of palmitic acid(* : P<0.05, ** : P<0.01).

2) 생간탕가미방의 cytotoxicity에 미치는 영향

Palmitic acid+생간탕가미방군(The PA-SG group)을 물 추출군(Herb A), 에탄올 추출군(Herb B) 두 군으로 나눠 각각 50, 100, 200, 400, 500µg/ml의 농도로 투여하고 LDH assay 실시한 결과, 두 군 모두 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)에 비해 농도 의존적으로 cytotoxicity를 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4).

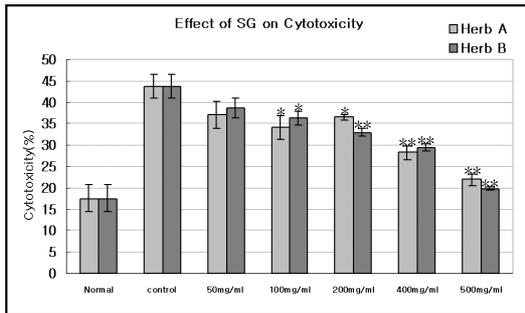


Fig. 4. Effect of SG on cytotoxicity in palmitic acid-treated HepG2 cell.

The normal group was treated with no fatty

acid. The control group was treated with 1mM -palmitic acid. The cells were incubated with various concentrations of SG(50, 100, 200, 400, 500µg/ml) in medium containing 1mM-palmitic acid for 24h. The cytotoxicity was measured by LDH assay. Herb A is water extract and Herb B is 70% ethanol extract. Compared with the Control group, cytotoxicity of the PA-SG group was significantly decreased(* : P<0.05, ** : P<0.01).

3. 세포내 triglyceride(TG) 축적에 미치는 영향

1) TG confocal 실험 결과

정상군은 bandpass filter 505-550nm에서 거의 형광이 발견되지 않았고, 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)은 505-550nm에서 노란빛의 형광이 관찰되었다. PA-SG군(1mM-Palmitic acid + 100µg/ml-생간탕가미방, 이하 물 추출물)은 대조군에 비해 505-550nm에서 노란빛의 형광이 감소됨이 관찰되었다(Fig. 5).

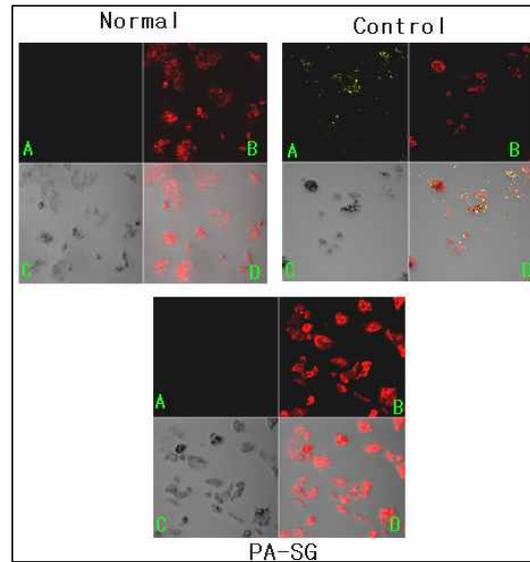


Fig. 5. Fluorescent microscopy image of HepG2 cell in Nile Red.

A)bandpass filter 505-550nm, B)bandpass filter 585-610nm, C)differential interference contrast, D)Overlay. Red color is phospholipid, yellow color is triglyceride.

2) TG 정량분석 결과

생간탕가미방의 지방축적 억제효과를 조사하기 위한 세포내 TG의 정량분석 결과, 대조군의 TG 양이 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고, PA-SG군의 TG 양은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6).

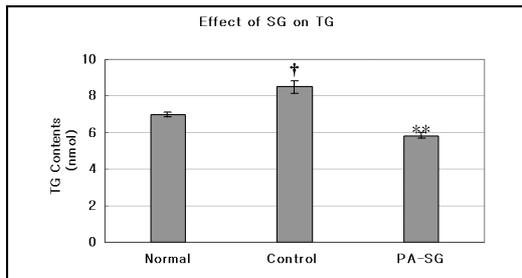


Fig. 6. Effect of SG on intracellular TG contents in palmitic acid-treated HepG2 cell.

Compared with the Control group, intracellular TG contents of the PA-SG group were decreased significantly([†] : P<0.05, P values compared with the Normal group. ^{**} : P<0.01, P values compared with the Control group).

4. 세포내 reactive oxygen species(ROS) 억제에 미치는 영향

1) ROS confocal 실험 결과

정상군은 530nm longpass의 emission filter에서 일부 세포가 녹색 형광을 나타내었고, 비교군(100µM-H₂O₂ treated)과 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)은 530nm filter에서 강한 녹색 형광을 나타내었으나, PA-SG군(1mM-Palmitic acid + 100µg/ml-생간탕가미방)은530nm filter에서 대조군에 비해 형광강도가 많이 감소된 모습이 관찰되었다(Fig. 7).

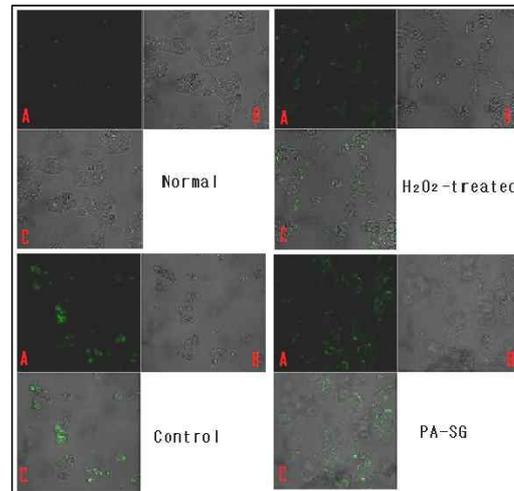


Fig. 7. Fluorescent microscopy image of HepG2 cell in carboxyl-H₂DCFDA.

A)530nm longpass emission filter, B)differential interference contrast, C)Overlay, green color is ROS.

2) ROS 정량분석 결과

생간탕가미방의 ROS억제효과를 조사하기 위한 세포내 ROS의 정량분석 결과, 대조군의 ROS양이 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고, PA-SG군의 ROS양은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8).

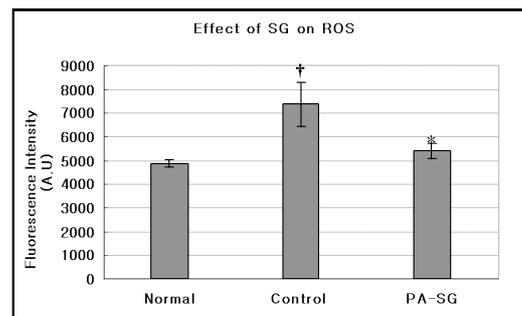


Fig. 8. Effect of SG on intracellular ROS level in palmitic acid-treated HepG2 cell.

Compared with the Control group, intracellular ROS fluorescence intensity of the PA-SG group were decreased significantly([†] : P<0.05, P values compared with the Normal group. ^{*} : P<0.05, P values compared with the Control group).

5. 미토콘드리아의 에너지 대사에 미치는 영향

생간탕가미방이 미토콘드리아의 에너지 대사에 미치는 영향을 조사하기 위해 미토콘드리아의 에너지 대사산물인 ATP량을 측정된 결과, 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)은 정상군에 비해 유의성있게 ATP량이 감소하였으나, 대조군과 PA-SG군(1mM-Palmitic acid + 100µg/ml-생간탕가미방) 사이엔 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 9).

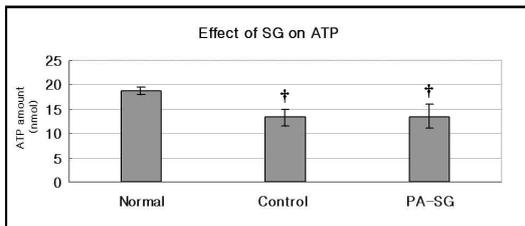


Fig. 9. Effect of SG on ATP amount in palmitic acid-treated HepG2 cell.

There were no significant differences in intracellular ATP amount between the control group and the PA-SG group(† : P<0.05, P values compared with the Normal group).

6. Glutathione S-Transferase(GST) 활성도 측정 결과

GST 활성도 측정 결과, 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)은 정상군에 비해 유의성있게 GST 활성도가 감소하였으나, 대조군과 PA-SG군(1mM-Palmitic acid + 100µg/ml-생간탕가미방) 사이엔 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 10).

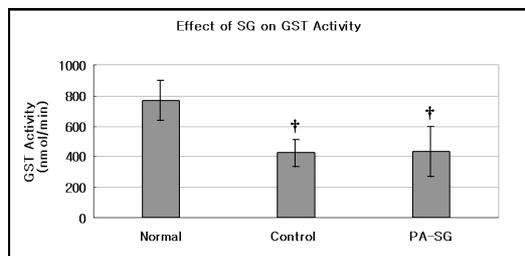


Fig. 10. Effect of SG on GST activity in palmitic acid-treated HepG2 cell.

There were no significant differences in GST activity between the control group and the PA-SG group(† : P<0.05, P values compared with the Normal group).

7. DNA fragmentation assay 결과

DNA fragmentation assay를 통해 세포사에 나타나는 DNA degradation을 관찰한 결과, 정상군은 1kb 이하의 작은 DNA fragment가 관찰되지 않았고, 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)은 작은 DNA fragment들이 연속적으로 연이은(smearing) necrosis 형태를 나타내었다. PA-SG군(1mM-Palmitic acid + 100µg/ml-생간탕가미방)은 약간의 DNA fragment들이 관찰되었으나 대조군보다 많이 감소된 양상을 보여 정상군과 유사한 모습이 관찰되었다(Fig. 11).

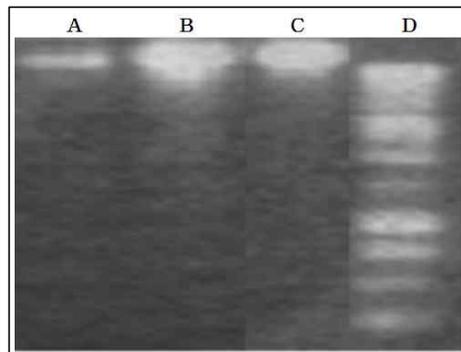


Fig. 11. Result of DNA fragmentation in HepG2 cell.

A)The Normal group(with no treatment), B)The Control group(with 1mM-Palmitic acid only), C)The PA-SG group(1mM-Palmitic acid + 100µg/ml-SG), D)molecular weight marker(0.1kb)

8. Caspase-3 intensity 소견

Caspase-3 intensity 측정 결과, 대조군(The Control group with 1mM-Palmitic acid only)은 정상군에 비해 caspase-3 intensity가 크게 증가하여 apoptosis 양상을 나타내었고, PA-SG군(1mM-Palmitic acid

+ 100µg/ml-생간탕가미방)은 대조군에 비해 caspase-3 intensity가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

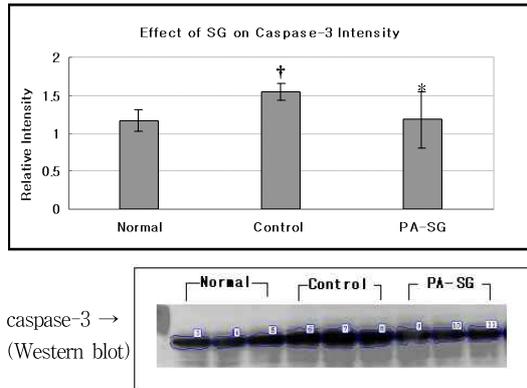


Fig. 12. Effect of SG on caspase-3 intensity in palmitic acid-treated HepG2 cell.

Caspase-3 expression of the PA-SG group was significantly reduced compared to the control group(† : P<0.05, P values compared with the Normal group. * : P<0.05, P values compared with the Control group).

IV. 고찰

비알코올지방간질환(NAFLD)은 습관적인 알코올의 남용이 없는 환자에서 알코올간질환과 유사한 간의 조직학적 손상을 보이는 질환이며, 비만, 인슐린 저항성, 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등의 대사증후군에서 흔히 나타난다. 단순 지방간은 비교적 예후가 좋으나 지속적인 지방축적으로 인해 간세포가 손상되면 광범위한 염증반응이나 섬유화를 동반하는 비알코올지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)으로 진행하며 심한 경우 간경변에 이르기까지 다양한 경과를 나타낸다. 특히 NASH는 원인 미상의 간경변의 가장 흔한 원인으로 추정되고 있다².

최근 비만, 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등의 유병률이 증가하면서 미국, 핀란드 등 질병통계가 비교적 양호한 나라의 경우 NAFLD가 전 국민

의 20-30%, NASH는 대략 2-3% 정도로 추정되고 있다^{22,23}. 우리나라는 아직 정확한 통계는 없으나 1995년부터 2005년 사이 비만 인구가 단기간 급격히 증가하고, 당뇨병 유병률도 증가하고 있어 이와 관련된 NAFLD의 유병률도 지속적으로 증가할 것으로 보인다⁴. 이에 따라 최근 학계의 관심도 높아져 다양한 연구가 이루어지고 있으나 아직 체계적 연구는 부족한 실정이며, NAFLD의 진행기전도 명확하게 밝혀져 있지 않다. 치료에 있어서도 특이하게 효과가 입증된 약물이나 치료법은 아직 없는 실정이다¹⁴.

한의학적으로 NAFLD는 濕痰의 대사장애로 起因되며 清熱利濕, 健脾消導, 消痰除濕 등의 治法을 주로 사용하고 있다^{24,25}. 최근 들어 동물실험 및 분자생물학적 실험을 통해 한약물의 NAFLD에 대한 효능 및 약리기전 연구가 다양하게 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁹. NASH 동물모델에서 인진청간탕과 인진사령산이 콜라겐의 침착을 유의성있게 감소시키고¹⁶, 통비음이 지방간 동물모델에서 간의 지방축적과 간세포사를 억제시키며¹⁷, 천궁이 고지방식이 동물모델의 GOT, GPT를 감소시키고 지방간을 억제한다고 보고¹⁸ 하였다.

본 실험연구에 사용한 생간탕가미방은 生肝湯에 鬱金, 山查, 丹蔘을 加味한 처방이다. 生肝湯은 실험 연구에서 간기능 개선²⁶, 간보호 작용²⁷, 고지혈증²⁸에 효과가 있다고 보고한 바 있으며, 임상적으로는 간염, 간경변, 간암에 관한 보고가 있었다²⁹⁻³¹. 鬱金, 山查, 丹蔘은 최근 임상에서 지방간 치료에 응용되고 있는데^{15,24}, 鬱金의 주요성분인 curcumin이 NAFLD모델 동물실험에서 간기능 개선 및 간내 TG감소, TNF-α억제 등의 효과가 있음이 보고된 바 있고³², 山查는 고지혈증 및 비만 동물 모델에서 콜레스테롤과 체중을 유의성 있게 감소시킨다는 보고가 있었으며³³, 丹蔘은 고지방식으로 유발된 NAFLD 동물 모델에서 혈청 MDA 수치 감소 및 leptin수치 증가를 보고한 바 있다³⁴.

생간탕가미방은 선행연구에서 고지방식으로 유

발된 NAFLD 모델 동물 실험에서 체중, TG 및 fat granule과 염증관련 인자인 TNF- α 를 유의성 있게 감소시켜 NAFLD의 진행과정에 있어 지방침착 억제 및 염증 억제를 통한 간세포보호 작용이 있음을 확인한 바 있다¹⁹. 이에 저자는 생간탕가미방의 약리기전을 분자생물학적인 연구를 통해 보다 심도있게 살펴보고자 하였다. 세포독성 억제 효과, 항산화, 항염증 작용 및 세포사에 미치는 영향 등을 보기 위해 MTT assay, LDH assay, 세포내 TG level 측정, ROS level 측정, ATP 정량분석, GST 활성도 측정, DNA fragmentation assay, caspase-3 intensity를 측정하였다.

NAFLD의 진행과정과 관련된 기전 연구는 꾸준히 이루어지고 있으나, 아직 단순 지방증에서 지방간염과 섬유화로 진행되는 명확한 발병기전은 현재까지 알 수 없다. 하지만 최근 'two-hit' hypothesis가 제안되면서 간세포 내 과도한 지방 축적이 지방간염의 시작이 된다는 의견이 형성되고 있다³⁵. 'First hit'은 간의 지방증을 형성하는 것으로, 간으로 유입된 지방산은 간세포의 미토콘드리아에서 산화되거나, 효소에 의해 중성지방으로 변환되고, 인지질의 합성이나 콜레스테롤 에스테르를 만드는 데 이용된다. 이때 중성지방의 대부분은 간에서 다른 조직으로 내보내기 위해 생성되는데 이를 위해 apoprotein과 결합한 lipoprotein형태로 분비된다. 그런데, 이 과정들에 장애가 생겨 간에 과잉의 중성지방이 축적되면서 지방증이 발생한다¹⁴. 따라서 'First hit' 단계인 지방침착에 미치는 효과를 확인하고자 세포내 triglyceride level을 측정하였다.

단순 지방증은 'second-hit' 과정에서 산화 스트레스로 인한 간손상을 일으키게 된다. 이 과정에서 인슐린저항성, 미토콘드리아의 기능이상과 에너지 대사 장애, 지질과산화와 ROS 증가는 중요한 기전으로 작용한다고 알려져 있다¹⁴. NASH는 그 발병기전에서 미토콘드리아 이상 소견이 많이 발견된다³⁶. 간으로 과도하게 유입된 유리지방산은 미토콘드리아에서 산화가 증가되고, 산화과정에서 발생한

전자가 미토콘드리아 respiratory chain에서 원활하게 전달되지 못하면 미토콘드리아에 ROS가 증가되어 미토콘드리아 DNA를 손상시키고 지질과산화를 일으키며 이 과정에서 생성된 독성물질이 다시 respiratory chain을 손상시키는 악순환을 일으킨다³⁷. 미토콘드리아 생산물인 ATP는 세포 생존에 꼭 필요하며 미토콘드리아 기능이상에 따른 ATP감소는 간세포 손상을 초래한다. NASH 환자에서 ATP의 감소 및 감소된 ATP의 회복이 정상인에 비해 매우 느린 것으로 알려져 있다³⁸. 따라서, 과도한 지방축적으로 인한 간세포의 미토콘드리아 기능이상과 에너지 대사 장애에 한약물이 미치는 영향을 살펴보고자 ATP를 정량분석하였다.

산화스트레스는 간세포 손상의 주된 기전으로 잘 알려져 있다. 간세포 내 지방산의 산화작용은 주로 미토콘드리아에서 β 산화반응을 통해 이루어지지만 간내 유입된 유리지방산이 과도할 땐 과산화소체, 미세소체에서도 산화작용이 일어난다². 미토콘드리아의 β 산화반응 포화 및 과산화소체의 β 산화반응등으로 ROS가 증가하고 이로 인해 간세포막이 손상된다. 미세소체 효소인 시토크롬 P450 2E1(CYP2E1)과 CYP4A1이 지방산이나 케톤을 분해하는 과정에서도 ROS가 발생되고 이 지질과산화 과정에서 생성된 최종산물이 다시 산화스트레스를 일으키는 악순환이 반복된다³⁹. 산화스트레스를 일으키는 ROS와 지질과산화의 최종산물들은 염증을 유발하고 간세포사멸을 직접 일으키거나, 염증성 시토카인 TNF- α , TGF- β 의 분비를 유도하여 간섬유화를 촉진한다⁴⁰. 산화스트레스 억제에 미치는 한약물의 효과를 보기 위해 ROS level을 측정하였고, 산화스트레스와 관련해 산화환원력에 미치는 효과도 함께 보기 위해 세포내 GST 활성도 측정을 하였다. GST는 ROS와 glutathione을 반응시키는 효소이며 glutathione은 ROS의 대표적 환원제로 잘 알려져 있어⁴¹, GST 활성도 측정을 통해 환원력을 평가해 보았다.

한약물의 간세포 보호 효과를 확인하기 위해

MTT assay, LDH assay를 통해 세포독성과 세포 활성도를 측정하였고, 세포사의 형태 및 그에 미치는 약물의 효과를 살펴보고자 Western blot을 통해 caspase-3 intensity를 측정하고, DNA fragmentation assay를 하였다. caspase는 시스테인(cysteine) 단백질 분해효소로서 apoptosis를 억제하고 있는 단백질을 분해하여 apoptosis를 진행시킨다. caspase-3는 caspase family 중의 하나이며 세포내 여러종류의 기질단백을 절단하여 apoptosis를 진행시킨다. apoptosis의 신호전달기전은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 caspase-3는 여러 세포사멸 경로가 공통으로 통과하는 중요한 경로로 알려지고 있다⁴². 따라서 caspase-3 intensity를 통해 apoptosis를 확인할 수 있다.

간세포 내 지방산이 축적되는 경우 포화지방산의 독성이 잘 알려져 있어 본 실험에선 대표적 포화지방산인 palmitic acid로 처리하였는데, 이는 지방산 종류와 농도에 따라 간독성을 평가한 기존 실험논문 결과를 근거로 하였다⁴³.

실험 결과, MTT assay를 이용한 cell viability 측정에서는 palmitic acid가 0.25 mM에서 알 수 없는 이유로 약간의 증가를 보였지만 1 mM 이후 농도의존적으로 cell viability가 감소하는 추세를 보이고 1 mM에서 cell viability가 이미 71.6 %로 감소되어 palmitic acid가 간세포의 기능에 심각한 영향을 주고 있음이 확인되었다(Fig. 1). 1 mM의 palmitic acid와 농도별 생간탕가미방을 함께 투여하여 생간탕가미방의 농도별 효과를 확인한 결과 물추출물, 에탄올 추출물 모두 유사하게 농도의존적으로 cell viability를 증가시키는 것으로 나타나 두 추출물 모두 우수한 보호효과를 나타내었다(Fig. 2).

LDH assay를 통해 세포독성을 측정한 결과, palmitic acid의 농도가 0 mM에서 0.5mM까지 범위에서는 세포사가 거의 관찰되지 않다가 1mM에선 정상군에 비해 16.7%로 급격히 증가했고($p < 0.01$) 그 이후 농도의존적 증가를 나타내었다(Fig.

3). 1mM의 palmitic acid와 함께 농도별 생간탕가미방 추출물들을 각기 투여한 결과 물추출물, 에탄올 추출물 모두 유사하게 농도의존적으로 cytotoxicity를 감소시키는 것으로 나타났는데, 물추출물과 에탄올 추출물 100 μ g/ml 농도에서 각기 34.1%, 36.2%로 감소하여($p < 0.05$) 두 추출물 모두 우수한 보호효과를 나타내었다(Fig. 4).

본 실험에서 대조군 처리시 palmitic acid의 농도는 1mM로 고정하였는데, 이는 앞서 결과에서 보인 바와 같이, 이 농도에서 palmitic acid에 의한 cell viability 감소와 세포독성이 충분히 관찰되었고 과하게 높은 농도의 불특정 기전에 의한 세포사 가능성을 배제할 수 있기 때문이다. 또, 생간탕가미방의 활성성분이 지용성일 가능성을 고려하여 MTT assay, LDH assay에서 물전탕 추출물과 에탄올 추출물 두 군으로 나누어 진행하였으나 물전탕 추출물과 에탄올 추출물 모두 우수한 세포보호 효과를 나타내었고 농도의존성 효과도 거의 동일한 양상을 보여 추후의 실험은 물전탕 추출물로만 진행하였다.

세포내 triglyceride confocal 실험에서 Nile red는 수용액에서는 형광을 나타내지 않고 유기용매에서 형광을 나타내며 유기용매 환경이 달라지면 형광의 특성도 변화되는 특성이 있다. 세포막의 구성물질인 인지질에 녹아 있을 때 580 nm 근처에서, 지방입자의 구성물질인 triglyceride에 녹아 있을 때는 530 nm 근처에서 빛을 각기 방출한다. 이에 근거하여 HepG2 세포주 내에 생성된 지방입자를 confocal microscope로 나타내었다. 현미경 관찰 결과 palmitic acid에 의해 세포내 triglyceride 생성이 증가된 것을 확인하였고, 100 μ g/ml의 생간탕가미방 추출물이 같이 투여된 경우 triglyceride의 축적이 억제됨을 보였다(Fig. 5). 현미경 관찰에서 보인 생간탕가미방의 지방축적 억제효과를 정량적으로 조사하기 위하여 세포내 TG 정량을 실시하였고 그 결과 PA-SG군이 대조군에 비해 세포내 TG양을 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 6).

이는 현미경 상의 결과와 정확히 일치하며, 생간탕가미방이 'First hit'인 지방침착 단계에서 간세포손상을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

세포내 ROS level 측정은 confocal 실험과 정량 분석으로 나누어 실시하였다. carboxyl-H2DCFDA는 그 자체로는 형광이 없지만 세포내로 축적된 후 ROS와 반응하면 530nm이상의 filter에서 형광을 내는 물질이다. 현미경 상에서 대조군은 530nm filter에서 강한 형광을 나타내 증가된 ROS가 관찰되었고, 100µg/ml의 생간탕가미방을 함께 처리한 결과 형광이 많이 약화된 모습을 통해 ROS가 감소했음을 알 수 있었다(Fig. 7). 현미경 관찰 결과를 정량적으로 확인하기 위하여 형광계를 이용해 ROS양을 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군의 ROS는 크게 증가하였고 PA-SG군의 ROS는 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 8). 이는 생간탕가미방의 주요 기전이 항산화효과와 연관되고 있음을 시사하고 있다.

환원력에 미치는 영향을 보기 위한 GST 활성도 측정에선 palmitic acid 처리시 GST 활성도가 유의성 있게 감소하는 것은 확인했으나 생간탕가미방 처리시 GST 활성도가 다시 증가하지는 않았다(Fig. 10). 생간탕가미방은 GST 활성도에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나 산화환원에 관련하는 인자는 매우 다양하고, 세포내 ROS의 양을 유의성 있게 감소시키는 것으로 볼 때 분명 환원력 증가에도 영향을 미칠 것으로 추측된다. 따라서 추후 다양한 환원인자에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

미토콘드리아 기능이상과 에너지 대사 장애에 미치는 영향을 살펴보고자 미토콘드리아의 에너지 대사물인 ATP를 정량분석한 결과, PA-SG군과 대조군 사이 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 9). 이 결과 생간탕가미방이 세포보호효과와 ROS의 감소효과를 가지고 있음에도 불구하고 미토콘드리아의 기능정상화에 직접 영향을 주지는 않는 것으로 생각된다.

세포사의 형태를 보기 위해 DNA fragmentation 과 caspase-3 intensity를 실험한 결과, DNA fragmentation에서 대조군은 작은 DNA fragment 들이 연속적으로 연이은 모습을 보여 necrosis 양상을 나타내었고, PA-SG군은 약간의 DNA 조각을 보이긴 했지만 대조군에 비해 훨씬 감소된 양상을 보였다(Fig. 11). caspase-3 intensity 측정 결과, 대조군은 정상군에 비해 caspase-3 intensity가 크게 증가하여 apoptosis양상을 나타내었고, PA-SG군은 대조군에 비해 caspase-3 intensity가 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12). 지방산 과다침착시 necrosis와 apoptosis 형태가 모두 나타났으며, 생간탕가미방이 두가지 형태에서 모두 세포보호 효과를 나타내었음을 알 수 있다.

이상으로 선행 동물실험연구에서 체중 감소, 간조직 내의 지방 축적 억제 및 염증인자 억제 효과를 확인한 바 있는 생간탕가미방의 약리 기전을 인간 간세포와 유사한 생리작용을 나타내는 HepG2 cell을 이용해 분자생물학적인 연구방법으로 살펴 보았고, 유의성 있는 결과를 얻었다. 종합해 볼 때 생간탕가미방은 세포사의 형태에 관계없이 유의성 있는 간세포보호 효과를 나타내었고, 세포내 TG 축적 억제 및 세포내 ROS발생을 감소시켰다. 이 약리기전을 통해 단순 지방증 단계부터 세포손상으로 인한 다음 단계로의 진행 모두에서 중요한 효과를 나타낼 수 있고, NAFLD의 치료제로서의 의미를 충분히 가진다고 생각할 수 있다. 하지만, 환원력 회복 및 미토콘드리아 기능 이상, 기타 간손상 기전에 미치는 효과에 대해서는 추후 심도있는 연구가 지속적으로 이루어질 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

생간탕가미방이 비알코올지방간질환(NAFLD)에 미치는 효과의 약리기전을 살펴보고자, HepG2 cell에 palmitic acid를 처리하여 생간탕가미방을 투여

해 MTT assay, LDH assay, 세포내 Triglyceride level 측정, 세포내 reactive oxygen species(ROS) level 측정, 세포내 ATP 정량분석, 세포내 GST 활성도 측정, DNA fragmentation assay, caspase-3 intensity를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 생간탕가미방은 MTT assay 결과 대조군에 비해 농도의존적으로 cell viability를 유의성 있게 증가시켰다.
2. 생간탕가미방은 LDH assay 결과 대조군에 비해 농도의존적으로 cytotoxicity를 유의성 있게 감소시켰다.
3. 생간탕가미방은 TG confocal 실험에서 TG 형광색소가 거의 발견되지 않았고 TG level은 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
4. 생간탕가미방은 ROS confocal 실험에서 ROS 형광색소가 감소하였고 ROS level은 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
5. 생간탕가미방은 ATP 정량분석과 GST 활성도 측정 결과 대조군에 비하여 유의성 있는 차이가 없었다.
6. 생간탕가미방은 DNA fragmentation assay 결과 대조군에 비해 cell necrosis 패턴을 감소시켰다.
7. 생간탕가미방은 대조군에 비해 caspase-3 intensity를 감소시켰다.

이상에서 생간탕가미방은 세포내 triglyceride 축적 억제 및 세포내 ROS발생을 감소시키고 세포괴사와 세포사멸을 동시에 억제하는 것으로 나타났다. 이는 단순지방증에서 간손상으로 진행되는 과정을 억제하는 효과를 시사하는 것으로 사료되며 향후 생간탕가미방의 치료기전에 대한 보다 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis : Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc. 1980;55(7):434-8.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med. 2002;346:1221-31.
3. Choi SY, Kim DH, Kang JH, Park MJ, Kim YS, Lim SH, et al. Nonalcoholic fatty liver disease as a risk factors of cardiovascular disease: relation of nonalcoholic fatty liver disease to carotid atherosclerosis. Korean J Hepatol. 2008; 14:77-88.
4. Park SH, Park CK. Pathogenesis and management of nonalcoholic steatohepatitis. JKMA. 2005;48: 169-78.
5. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. Clin Liver Dis. 2004;8:521-33.
6. Adams LA, Angulo P. Recent concepts in nonalcoholic fatty liver disease. Diabet Med. 2005;22:1129-33.
7. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes. 2001;50:1844-50.
8. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology. 2003;37:917-23.
9. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression *via* a lysosomal pathway. Hepatology. 2004;40:185-94.
10. Jeffrey D Browning, Jay D Horton. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. The Journal of Clinical Investigation. 2004;114(2):

- 147-51.
11. 이동석, 권기태, 조창민, 탁원영, 권영오, 김성국 외. 비알코올성 지방간질환에서 지방간염의 진단 및 간섬유화 정도의 예측인자. 대한간학회지. 2003;9(3):14-20.
 12. 김상진, 박중원, 김미경, 김형준, 홍요한, 한성혁 외. 비알코올성 지방간 환자에서 지방간염의 병리학적 심화도를 예측할 수 있는 임상적 지표들. 대한소화기학회지. 2000;36:782-92.
 13. Rallidis LS, Drakoulis CK, Parasi AS. Pravastatin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Atherosclerosis*. 2004; 174:193-6.
 14. 유권. 비알콜성 지방간염. 대한간학회지. 2002; 8(1):66-72.
 15. 趙和平, 段曉燕. 降脂益肝沖劑治療非酒精性脂肪肝的實驗研究. *Drug evaluation*. 2007;4(2):114-6.
 16. 윤경수. NASH 동물모델에서 인진청간당과 인진사령산의 효과규명. 대한한방내과학회지. 2009; 30(2):410-21.
 17. Lee KT, Kim YS, Seol IC. Effects of TongBiYeum on the Fatty Liver. *Korean Journal of Oriental Medicine*. 2003;24(4):11-8.
 18. 성태수, 손규목. 천궁의 열수추출액이 고지방식이에 의한 흰쥐의 혈장 중 효소활성과 호르몬 및 간장의 지방축적에 미치는 영향. *Korean Journal Food & Nutrition*. 1994;7(2):108-13.
 19. 최미영. 가미생간탕이 고지방식으로 유발된 지방간에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2009; 30(2):365-74.
 20. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울;한국메디칼인텍스사. 1998:109-619.
 21. J.Sambrook, E.F.Fritsch, T.Maniatis. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed. 1989:18-60-75.
 22. Bakon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology*. 1994;107:1103-9.
 23. Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;45:46-52.
 24. 吳其愷, 程井軍, 聶廣. 脂炎消煎劑治療非酒精性脂肪肝 63例的臨床觀察. *CJ GMTCM*. 2007; 22(2):34-5.
 25. 전국한의과대학 간계내과학 교수 공저. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원; 2001, P. 315-22.
 26. 이창규. 生肝湯이 CCl₄ 및 d-galactosamine에 의하여 유발된 흰쥐의 간장해에 미치는 영향. 경희대학교 대학원, 1986.
 27. 최서형. 生肝湯과 그 분획이 간장보호, 혈소판 응집능 및 일반 면역기능에 미치는 영향. 경희대학교 대학원; 1987.
 28. 류경하. 生肝湯이 고지혈증에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1988.
 29. 승현석, 박신명, 한창우, 김영철, 이장훈, 우홍정. 加減生肝湯을 투여하여 호전된 급성 간염 2례. 대한한방내과학회. 2002;23(2):226-37.
 30. 김영철, 이장훈, 우홍정. 중풍을 동반한 초기간경변증 치험 1례. 대한한방내과학회 별책부록. 1999;19(2):21-8.
 31. 김동우, 김덕호, 우홍정, 김병운. 加減生肝湯을 투여한 간염환자에 관한 연구. 대한한의학회지. 1991;12(2):233-49.
 32. TAN De-an, FU Wei-ling, ZHOU Zhi-guang. Experimental study of effect of curcumin treatment on rat nonalcoholic fatty liver disease. *重慶醫學*. 2007;36(16):1626-8.
 33. 반상석, 윤현덕, 신오철, 신유정, 박치상, 박지하 외. 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐에 茵陳, 枳實, 山查가 미치는 영향. 대한본초학회지. 2006;21(3):55-67.
 34. Sun Liwei, Huang Miaozen. The effect of Danshen on the nonalcoholic fatty liver rats MDA,

- SOD, TNF, Leptin. *J. of Zhejiang Uni. of traditional Chinese Med.* 2007;31(6):696-8.
35. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114:842-5.
 36. Maechler P, Wolloheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature.* 2001 ;414:807-12.
 37. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol chem.* 2002;277:44784-90.
 38. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Jezzoni JC, Hesenheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in nonalcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 1999;31:430-4.
 39. Chen J, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI. Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal(HNE): role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1380:336-44.
 40. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2000;21: 49-98.
 41. John D. Hayes, David J. Pulford. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Clinical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 1995;30(6):445-600.
 42. Srinivas Kothakota, Toshifumi Azuma, Christoph Reinhard, Anke Klippel, Jay Tang, Keting Chu, et al. Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science.* 1997;278(10):294-7.
 43. Maria Jose Gomez-Lechon, Maria Teresa Donato, Alicia Martinez-Romero, Nuria Jimenez, Jose Vicente Castell, Jose-Enrique O'Connor. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-Biological Interactions.* 2007; 165:106-16.