



Original Article / 원저

고지방식이 비만마우스 모델에서 降脂丸과 降脂丸+加味消滯丸의 비알콜성 지방간질환 개선효과 비교

장두현¹ · 정양삼² · 김종훈³ · 김병출⁴ · 석화준⁵ · 유재상⁶ · 구자룡⁷ · 윤기현⁸ · 조주흠⁹ · 이혜림⁸ · 노종성⁸ · 윤호영⁸ · 윤미정¹⁰ · 신순식^{8*}

¹청남한의원 · ²정양삼한의원 · ³능인한의원 · ⁴고려한의원 · ⁵수정한의원 · ⁶봉황한의원 · ⁷소리청한의원 · ⁹우심한의원 · ¹⁰목원대학교 바이오건강학부 · ⁸동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소

Comparison of Gangjihwan and Combination of Gangjihwan and Gamisochehwan in the Improvement Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a High Fat Diet-Fed NAFLD Mouse Model

Du Hyon Jang¹ · Yang Sam Jung² · Jong Hoon Kim³ · Byeong Chul Kim⁴ · Hoa Jun Seok⁵ · Jae Sang Yoo⁶ · Ja Ryong Ku⁷ · Ki Hyeon Yoon⁸ · Ju Heum Jo⁹ · Hye Rim Lee⁸ · Jong Seong Roh⁸ · Ho Young Yun⁸ · Michung Yoon¹⁰ · Soon Shik Shin^{8*}

¹Chungnam · ²Jungyangsam · ³Neungin · ⁴Goryo · ⁵Soojung · ⁶Bonghwang · ⁷Soricheong Luck and ⁹Woosim Korean Medicine Clinic · ¹⁰Dept. of Life Sciences, Mok-Won University, Daejeon 302-729, South Korea · ⁸Dept. of Formula Sciences and Research Institute of Korean Medicine for Diabetes and Obesity, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, Busan, 614-851, South Korea

ABSTRACT

Objectives : This study investigated the improvement effects of Gangjihwan (DF) and combination of Gangjihwan and Gamisochehwan (GSH) on nonalcoholic fatty liver disease in a high fat diet-induced obese mouse model.

Methods : Eight-week-old C57BL/6N mice were divided into five groups: a normal lean group given a standard diet, an obese control group given a high fat diet, and atorvastatin, DF, and DF+GSH groups given a high fat diet with atorvastatin (10 mg/kg), DF (40 mg/kg), and DF+GSH (80 mg/kg), respectively. After 8 weeks of treatment, body weight gain, blood lipid markers, ALT concentrations, liver weight and histology were examined.

Results : 1. Body weight gain was significantly decreased in DF, DF+GSH and atorvastatin groups compared with control. The extent of decreases was eminent in DF+GSH group.

2. Circulating concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were decreased in DF, DF+GSH and atorvastatin groups compared with control. The decreases were significant in DF+GSH and atorvastatin groups.

3. Liver weights were decreased in DF, DF+GSH and atorvastatin groups compared with control. In particular, liver weight was significantly reduced only in DF+GSH group.

4. Hepatic lipid accumulation was significantly decreased in DF, DF+GSH and atorvastatin groups compared with control, and the magnitude of which was more effective in DF+GSH group than in DF-only group.

5. Circulating ALT concentrations were decreased in DF, DF+GSH and atorvastatin compared with control, but ALS levels were significantly reduced only in DF+GSH group.

Conclusions : In conclusion, these results suggest that DF decreases body weight gain, improves blood lipid metabolism, and reduces liver weight and hepatic lipid accumulation, contributing to the improvement of nonalcoholic fatty liver disease. In addition, these effects were more effective in DF+GSH combination group than in DF-only group.

Keyword : Gangjihwan, nonalcoholic fatty liver disease, Gamisochehwan, ALT, cholesterol

I. 緒 論

비알콜성 지방간질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 주 140g 미만의 알코올 섭취량에도 불구하고 간세포 내에 중성지방이 10% 이상 축적되어 있는 상태를 말한다¹⁾. 이것은 일반적으로 매우 적은 임상적 의미를 가진 부수적인 병리 소견으로 간주되었다²⁾. 그러나 NAFLD는 대사증후군의 특성과 관련되어 있고, 비만한 사람과 제2형 당뇨병 환자에서 비만의 정도와는 독립적으로 그 유병률이 높았다³⁾. 또한 우리나라 비알콜성 지방간의 유병률이 2004년 11.5%에서 2010년 23.6%로 6년새 2배 정도 급격히 증가한 것으로

나타나⁴⁾ 비알콜성 지방간 치료에 대한 중요성이 점점 커지고 있다. 또한 심혈관질환 및 대사질환의 원인과 발병에서 중추적인 역할을 하는 것으로 보고되어⁵⁾ 대사증후군에서 발현되는 부수적인 증상이 아니라 적극적인 치료가 필요한 대사질환으로 인식되고 있다.

降脂丸(Di-fatty, DF)는 현재 J 한의원에서 NAFLD 치료에 사용되고 있으며, 그 치료 효과를 실험적으로 입증하여 학술논문으로 발표한 바 있다⁶⁾. 또한, J 한의원에서는 消滯丸⁷⁾을 加減하여 만든 가미소체환(GSH)를 消食劑로 DF와는 별개로 다년간 사용해 오다가 우연히 두 방제를 병용하여 NAFLD 치료제로 사용한 결과 그 효과가

* Corresponding author : Soon Shik Shin, PhD, Professor, Department of Formula Sciences and Research Institute of Korean Medicine for Diabetes and Obesity, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57 Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 614-851, South Korea.

· Tel : 82-51-850-7414, Fax : 82-51-853-4036

· E-mail : ssshin@deu.ac.kr

· Received : May 15, 2014 / Revised : June 12, 2014 / Accepted : June 16, 2014

우수하여 다년간 사용해 왔다. 실험적으로도 DF 단독으로 사용할 때와 DF에 GSH를 병용할 때의 NAFLD의 개선효과에 차이가 있는지를 조사하였다.

이를 위해 고지방식이 유발 수컷 비만 마우스 모델을 이용하여 DF와 DF+GSH의 경구 투여가 NAFLD의 개선에 미치는 영향을 체중 증가량과 혈중 지질대사 관련 지표 및 간 조직 분석 등으로 조사하였다.

II. 실험재료 및 연구방법

1. 실험재료

1) 실험동물

(주)샘타코(샘타코바이오키리아 Inc., Korea)에서 공급한 7주령의 C57BL/6N 수컷 마우스를 구입하여 1주 간 실험실 환경에 적응하도록 한 후 사용하였다. 실험 기간 동안 온도 21±2°C, 습도 55±5%, 환기 횟수 15~17회/hour, 조도 150~300lux, 그리고 조명에 12시간의 명암(점등: 06:00, 소등: 18:00) 주기가 있는 실험실 환경에서 고행사료(Harlan, USA)와 물을 자유롭게 공급 받았다.

2) 실험물질

실험물질인 DF와 GSH의 조성약물은 화림 제약(Busan, South Korea)에서 구입한 후 동의대학교 한의과대학 방제학교실에서 정선하여 ultrafine particle crusher (Korea Patent R&D Institution, Busan, South Korea)에 300mesh로 초미립 분쇄하여 냉장보관하고 실험에 사용하였다. 조성약물은 다음과 같고(Table 1-2), 마황은 파키스탄산 마황을 구입하여 사용하였으며, 양성대조군으로는 atorvastatin

Table 1. The composition of DF

韓藥名	Ingredient	%
麻黃	Ephedra intermedia Schrenk et C. A.Meyer	40
大黃	Rheum palmatum L	20
紫草	Lithospermum erythrorhizon Siebold et Zuccarini	40
Total amounts		100

Table 2. The composition of GSH

韓藥名	Ingredient	%
甘草	Glycyrrhiza uralensis Fischer	18.4
香附子	Cyperus rotundus Linne	15.3
山植肉	Zingiber officinale Roscoe	8.6
乾薑	Crataegus pinnatifida Bunge	6.0
茯苓	Poria cocos Wolf	6.0
肉桂	Cinnamomum cassia Blume	6.0
高良薑	Alpinia officinarum Hance	3.7
貢砂仁	Amomum villosum Loureiro	3.7
枳實	Poncirus trifoliata Rafinescul	3.7
木香	Aucklandia lappa Decne.	3.7
白豆蔻	Amomum cadamomum Linne	3.7
山椒	Zanthoxylum bungeanum Maxim.	3.7
訶子皮	Terminalia chebula Retzins	3.7
白朮	Atractylodes macrocephala Koidzumi	3.7
藜蘆	Piper longum Linne	3.7
藿香	Pogostemon cablin Bentham	3.7
丁香	Syzygium aromaticum Merrill et Perry	1.8
薄荷腦	Mentha arvensis Linne var. piperascens Malinvaud	0.9
Total amounts		100

calcium (Pfizer Ireland Phamaceuticals Drug Product Plant, Loughbeg, Ringaskiddy. Co, Cork, Ireland) 을 사용하였다.

3) 실험군 및 투여방법

각 군당 9마리를 체중에 따라 무작위하게 군 분리를 실시하였다. 8주 동안 normal 그룹은 10Kcal% fat의 일반 식이를 공급하고, control, 양성대조군, 약물 그룹은 45 Kcal% fat의 고지방식이를 공급하여 NAFLD를 유발하였다. 그 후 DF는 40 mg/kg의 농도로, DF+GSH는 80 mg/kg의 농도로, 양성대조군인 atorvastatin은 10 mg/kg의 농도로⁸⁾ 8주간 경구 투여하였다(Table 3).

2. 연구방법

1) 체중 증가량 측정

DF, DF+GSH 및 atorvastatin이 체중 증가량에 미치는 영향을 알아보기 위해 약물을 투여하는 8주 동안 매주 2회씩 체중을 측정하고 체중

증가량을 계산하였다.

2) 혈액생화학 분석

혈액 채취는 경구 투여 시작 8주 후 12시간 절식한 뒤 diethyl ether로 마취한 다음 심장에서 혈액 1ml를 채취하였다. Blood clotting을 위해 30분 이상 실온에서 방치한 후 고속원심분리기(Micro12, Hanil, Korea)를 이용하여 3000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 분리된 혈장은 냉동고(-20℃)에 보관하고 혈액생화학분석기(Modular analytics, Roche, Germany)를 사용하여 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, γ -glutamyl transferase, high density lipoprotein cholesterol(HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol(LDL-cholesterol), total cholesterol, triglyceride, glucose의 혈중 농도를 각각 측정하였다. Free fatty acid의 혈중 농도는 혈액생화학분석기(Modular analytics, Hitachi, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 혈중 insulin 농도는 혈액생화학분석기(Microplate reader, Molecular device, USA)를 사용하여 각각 측정하였다.

3) 동물부검

채혈한 뒤 부검하여 간장, 심장, 비장, 신장, 췌장 등의 각 장기 및 장간막 주변 백색지방조직(mesenteric adipose tissue, MAT), 생식기 주변 백색지방조직(epididymal adipose tissue, EAT)과 후복벽 주변 백색지방조직(retroperitoneal adipose tissue, RAT)의 무게를 측정하고 조직을 수집하였다.

4) 조직의 형태학적 분석

검체에서 분리한 조직은 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 이상 고정된 후 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 50% ethanol에서 2시간, 70% ethanol에서 2시간, 80% ethanol에서 2시간, 90% ethanol에서 2시간, 100% ethanol에서 2시간씩 3번 단계적으로 탈수시켰다. Xylen에서 1시간씩 3번의 투명과정 후 paraffin에 1시간씩 2번 침투를 실시하였다. 포매과정(embedding)을 거쳐 약 4 μ m의 두께로 박절

(paraffin-section)하여 slide에 조직을 얹고 건조시킨 다음 hematoxylen-eosin 염색을 하였다. Slide는 탈수과정을 거쳐 mounting medium(Sigma, MO, USA)을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 분석하였다. 조직의 사진촬영과 지방세포의 크기분석은 image analysis system(Image Pro-Plus, MD, USA)을 이용하였다.

3. 통계분석

모든 값은 mean \pm standard deviation(SD)으로 표시하며, OriginLab Version 9.1(OriginLab Corporation, MA, USA)의 one way ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

III. 實驗 結果

1. 체중 증가량과 지방무게

정상군에 비해 대조군은 체중 증가량이 40일째

Table 3. Experimental groups

Group	Diet	Treatment	Number	Sex
Normal	10 Kcal% fat	water	9	male
Control		water	9	male
Atorvastatin		10 mg/kg	9	male
DF	45 Kcal% fat	40 mg/kg	9	male
GSH		40 mg/kg	9	male
DF+GSH		80 mg/kg	9	male

부터 유의하게 증가하였고(P<0.05), 48일째부터 증가폭이 더욱 커져(P<0.01) 56일째를 제외하고 실험 종료 시까지 증가폭이 유지되었다. 대조군에 비하여 DF는 투여 후 4일째부터 유의하게 체중 증가량이 감소하였고(P<0.05), 8일째 감소폭이 증가하였다(P<0.001) 12일째부터 감소폭이 감소하였고 16일까지 유지되었다(P<0.01). 20일째부터는 체중 증가량의 변화에 통계적인 유의성이 없었으며 24일까지 유지되었다. 28일째부터 다시 체중 증가량이 통계적으로 유의하게 감소하였고(P<0.05), 32일째부터 그 정도가 증가하였으며(P<0.01), 60

Table 4. Changes in body weight gain of DF against high fat diet-fed NAFLD mice

	Normal	Control	Atorvastatin	DF	DF+GSH
4	-0.9±0.515	-0.607±0.785	-1.581±0.641*	-1.547±0.725*	-1.947±0.834**
8	-0.553±0.648	0.477±1.403	-1.544±1.635*	-2.503±1.336***	-2.947±0.878***
12	-0.409±0.852	-0.608±1.12	-2.207±1.566*	-2.652±1.162**	-2.429±1.155**
16	0.054±0.792	0.138±1.824	-1.993±1.432*	-1.841±0.721**	-2.069±0.805**
20	0.203±1.077	-0.884±1.767	-2.43±1.212*	-2.161±0.674	-2.339±0.982*
24	0.149±1.462	-0.692±1.525	-2.134±1.401	-1.536±0.777	-2.093±1.276
28	-0.173±1.213	-0.826±1.411	-2.571±1.605*	-2.096±1.009*	-2.163±1.214*
32	-0.071±1.246	0.766±1.512	-0.986±1.372*	-1.410±1.393**	-1.516±1.202**
36	0.109±1.609	1.273±1.551	-0.621±1.502*	-1.000±1.280**	-1.472±1.274***
40	0.326±1.828	2.223±1.659†	0.008±1.395**	-0.271±1.335**	-0.790±1.127***
44	0.757±1.676	2.922±1.877†	0.66±1.268**	0.116±1.666**	-0.383±1.052***
48	0.921±1.773	3.634±2.08††	1.427±1.209*	0.743±1.401**	-0.071±0.894***
52	1.008±1.467	3.782±2.009††	1.6±1.289*	1.228±1.609**	0.534±0.818***
56	1.531±1.637	4.124±2.123†	2.024±1.058*	1.421±1.492**	0.891±0.977***
60	1.798±1.563	4.832±2.23††	2.623±1.119*	1.967±1.418**	1.777±1.093**
64	2.196±1.879	5.554±2.406††	3.116±1.095*	1.416±1.384***	1.058±1.764***

Data are expressed as the mean±SD. † Value significantly different from normal, † p<0.05, †† p<0.01. * Value significantly different from control, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

일까지 그 상태를 유지하다가 64일째에 그 감소폭이 가장 현저한 것으로 나타났다(P<0.001). DF+GSH는 역시 투여 후 4일째부터 유의하게 체중 증가량이 감소하였고(P<0.01), 8일째 그 감소폭이 증가하다가(P<0.001) 12일째부터 잠시 감소폭이 줄어들었으며(P<0.01) 16일까지 유지되었다. 20일째는 그 감소폭이 더 줄어들었고(P<0.05) 24일째는 통계적인 유의성이 없다가 28일째부터는 다시 통계적인 유의성을 나타냈으며(P<0.05), 32일째부터 다시 체중 증가량 감소폭이 증가하였고(P<0.01), 36일째부터는 그 감소폭이 더 증가하였고(P<0.001), 56일까지 그 양상이 유지되다가 60일째 잠시 주춤하였고, 64일째에 그 감소폭이 가장 현저하였다(P<0.001). Atorvastatin은 투여 후 4일째부터 유의하게 체중 증가량이 감소되어(P<0.05) 24일째를 제외하고 체중 증가량의 감소폭이 유지되었다. 40일째에 체중 증가량의 감소폭이 증가하였으나(P<0.01), 48일째에 다시 그 감소폭이 줄어들어(P<0.05) 실험 종료 시까지 유지되었다 (Table 4, Fig. 1).

이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비해 DF

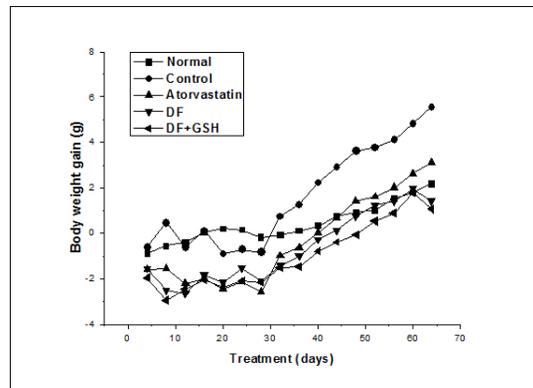


Figure 1. Changes of body weight gain in high fat diet-fed NAFLD mice.

는 59.37%, DF+GSH는 68.00%의 체중 감량효과가 있는 것으로 나타났다. 모두에서 통계적으로 매우 현저한 체중 감량효과가 있었고(P<0.001), 그 감소폭의 정도는 DF+GSH에서 더 큰 것으로 나타났다. Atorvastatin의 경우 대조군에 비해 28.12%의 체중 감량효과가 있었으며, 통계적으로 유의한 체중 감량효과를 보였다(P<0.05).

Table 5. Blood analysis data in high fat diet-fed NAFLD mice

unit	Blood analysis data					
	Normal	Control	Atorvastatin	DF	DF+GSH	
AST	U/L	156.333±42	212.556±103.5	178±159.708	180.667±55.032	137.222±32.05
ALT	U/L	28.889±4.595	95.222±42.967 ^{††}	60.667±48.399	84.556±72.602	31±18.453 ^{***}
γ-GT	U/L	0.433±0.05	0.444±0.133	0.378±0.139	0.367±0.087	0.422±0.067
HDL	U/L	137.444±11.749	158.778±14.712 [†]	137.556±14.134 ^{**}	138.889±39.139	139.556±14.037 [*]
LDL	mg/dl	20.667±5.809	40.111±9.493 ^{††}	24.778±6.058 ^{***}	31.889±14.391	25.333±8.986 ^{**}
TC	mg/dl	157.444±14.492	201.222±23.371 ^{†††}	160.778±17.188 ^{***}	167.333±50.03	160.667±23.356 ^{**}

Data are expressed as the mean±SD. † Value significantly different from normal, † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001. * Value significantly different from control, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

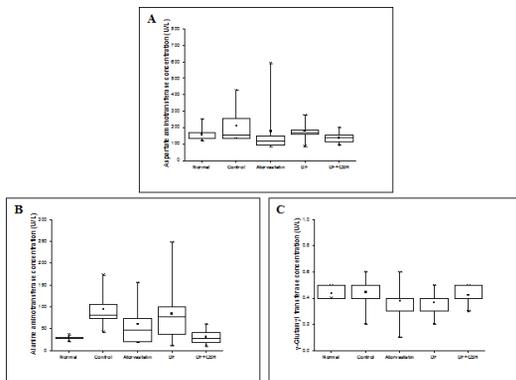


Figure 2. Fasting plasma aspartate aminotransferase(A), alanine aminotransferase(B) and γ-glutamyl transferase(C) levels in high fat diet-fed NAFLD mice.

2. 혈액생화학분석

1) 혈중 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase와 γ-glutamyl transferase (γ-GT) 농도

약물 투여 시작 8주 후 혈장 내 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase (ALT) 및 γ-glutamyl transferase(γ-GT)의 농도를 측정된 결과, AST와 γ-GT의 경우 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없는 것으로 나타났다. ALT의 경우, DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났으나 DF+GSH에서만 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다 (Table 5, Fig. 2).

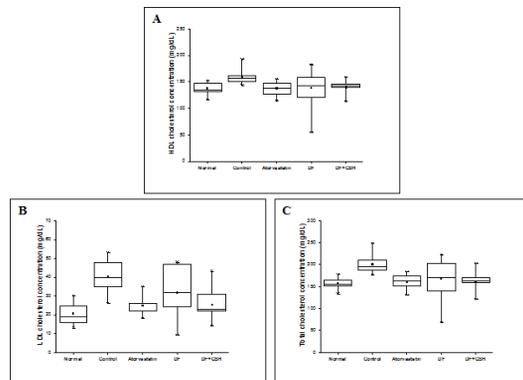


Figure 3. Fasting plasma HDL-cholesterol(A), LDL-cholesterol(B) and total cholesterol(C) levels in high fat diet-fed NAFLD mice.

HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein.

2) 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol 농도

약물 투여 시작 8주 후 혈장 내 total-cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol의 농도를 측정된 결과, 대조군은 정상군에 비하여 모든 값에서 통계적으로 유의하게 높은 수치를 보였다. Total cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 낮은 수치를 보였으며, DF+GSH와 atorvastatin에서 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다(Table 5, Fig. 3).

3. DF에 의한 간조직의 무게와 지방축적 변화

1) 간장 무게

실험종료 후 부검 시 간장의 무게를 측정된 결

Table 6. Liver weights in high fat diet-fed NAFLD mice

	Normal	Control	Atorvastatin	DF	DF+GSH
Liver weights(g)	1.094±0.106	1.587±0.332 ^{†††}	1.343±0.283	1.417±0.57	1.068±0.235 ^{**}

Data are expressed as the mean±SD. † Value significantly different from normal, † † † p<0.001. * Value significantly different from control, ** p<0.01.

Table 7. Histological analysis of hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed NAFLD mice

	Normal	Control	Atorvastatin	DF	DF+GSH
Lesion score	0.222±0.192	4±0 ^{†††}	3±0.333 ^{***}	3.556±0.192 ^{***}	0.333±0.333 ^{***}

Data are expressed as the mean±SD. † Value significantly different from normal, † † † p<0.001. * Value significantly different from control, *** p<0.001.

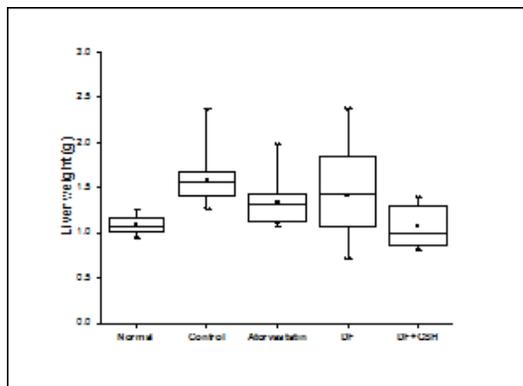


Fig. 4. Liver weights in high fat diet-fed NAFLD mice.

과, 정상군에 비해 대조군에서 통계적으로 유의하게 그 무게가 증가하였다. 대조군에 비하여 DF는 5.66%, DF+GSH는 19.55%, atorvastatin은 8.33%로 그 무게가 감소하였으며, DF+GSH에서만 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다(Table 6, Fig. 4).

2) 간조직의 지방축적 변화

고지방식이로 NAFLD가 유발된 Control 그룹 마우스는 상당량의 지방이 축적된 소견을 보였으나, DF를 투여한 그룹에서는 간의 지방축적이 감소된 양상을 보였다. 정상군에 비해 대조군은 통계적으로 유의하게 lesion score가 증가하였고, DF, DF+GSH와 atorvastatin은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 그 정도는 DF+GSH에서 더욱 현저하였다. 이를 백분율로 환산하면 DF는 5.88%, DF+GSH는 84.63% 감소하였고, atorvastatin은 14.29%의 감소폭을 보였다(Table 7, Fig. 5).

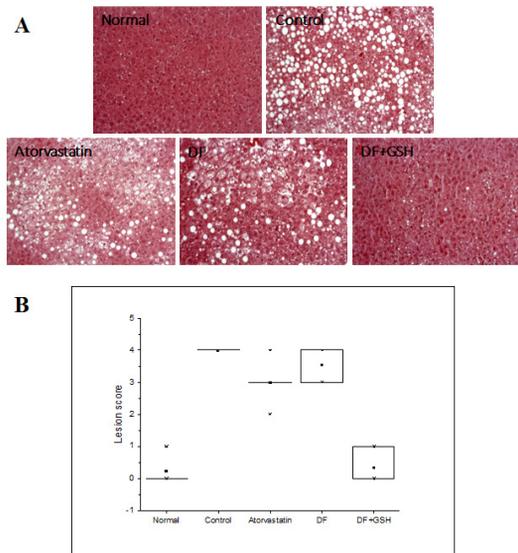


Figure 5. Inhibition of hepatic lipid accumulation by DF in high fat diet-fed NAFLD mice.

(A) Representative hematoxylin and eosin stained sections of livers are shown (original magnification X 100). (B) Pathological scores of hepatic accumulation are as follows: 0, no lesion; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; 4, very severe.

IV. 考 察

비알콜성 지방간은 비만과 밀접한 관련이 있으며, 인슐린 저항성이 NAFLD의 가장 중요한 인자로 알려져 있다⁹⁾. 과체중이나 비만인 비알콜 지방간 환자에서 체중 감량을 할 경우 간내 지방량이 감소하는 것으로 보고되었다^{10,11)}. 그리고 NASH의 발병기전은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만,

인슐린저항성에 의한 간내 지방축적에 산화성 스트레스가 가해져 염증이 발생하는 것으로 알려져 있다^{12,13}. 현재 NAFLD는 비만 비율의 극적인 증가에 따라 급속하게 확산되고 있는 것으로 여겨진다. 그러나 체중 감량 외에는 검증된 치료법이 없다는 점에서 분명하고 정확한 치료법이 필요하다¹⁴.

麻黃의 항비만 효과, 大黃의 항고지혈증 작용과 紫草의 항염증 작용은 간의 염증 및 과체중, 고지혈증을 기본 특성으로 하는 NAFLD에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되어 이 세 가지 약물로 降脂丸(DF)을 구성하고 고지방식이 NAFLD 모델 마우스를 이용하여 NAFLD의 개선에 미치는 영향을 조사하였다.

체중 증가량의 경우, 대조군에 비해 DF는 59.37%, DF+GSH는 68.00%의 체중 감량효과가 있는 것으로 나타났다. 모두에서 통계적으로 매우 현저한 체중 감량효과가 있었고($P<0.001$), 그 감소폭의 정도는 DF의 단독투여보다는 GSH를 병용투여했을 때에 더 큰 것으로 나타났다. Atorvastatin의 경우 대조군에 비해 28.12%의 체중 감량효과가 있었으며, 통계적으로 유의한 체중 감량효과를 보였으나($P<0.05$) DF와 DF+GSH에 비해서는 그 효과가 낮은 것으로 나타났다.

DF, DF+GSH와 atorvastatin의 지질대사 개선 효과를 알아보기 위해 관련 지표인 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol의 농도를 조사하였다. Total cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 낮은 수치를 보였으며, DF+GSH와 atorvastatin에서 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다.

체중감량효과와 일치하게 혈중 total cholesterol과 LDL-cholesterol의 농도 값이 DF+GSH에서 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타나 DF 단독 투여보다는 GSH를 병용투여하는 것이 체중감량 효과를 높이고 더불어 혈중 지질대사를 더 개선할 수 있음을 보여준다.

DF, DF+GSH와 atorvastatin의 NAFLD 개선 효과를 알아보기 위해 간장의 무게와 간 염증 지표 및 간세포의 조직학적, 형태학적 변화를 조사

하였다.

간장의 무게는 대조군에 비해 DF는 5.66%, DF+GSH는 19.55%, atorvastatin은 8.33%로 그 무게가 감소하였으며, DF+GSH에서만 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타나 체중의 변화와 일치하게 간장의 무게가 감소하는 양상을 보였다. 이와 일치하게 간세포의 지방축적은 DF, DF+GSH와 atorvastatin은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 lesion score를 감소하였으며, 그 정도는 DF의 단독투여보다는 GSH를 병용투여하였을 때에 더욱 현저하였다. 따라서 DF+GSH는 간세포의 지방축적을 억제하여 간장의 무게를 감소시키고 NAFLD를 개선하는데 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

또한 간 염증 지표인 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyl transferase (γ -GT)의 농도를 조사하였다. 혈중 AST와 γ -GT의 농도는 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없는 것으로 나타났다. 혈중 ALT의 농도는 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났으나 DF+GSH에서만 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다.

혈중 ALT 농도는 NAFLD에서의 간장 손상 정도를 예측할 수 있는 지표이며 증가된 혈중 ALT 농도는 간염유화 등 상당한 간의 조직학적 이상을 보여주는 것으로 보고되어 있어¹⁵⁻¹⁷, DF+GSH의 투여가 이를 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

그러므로 DF와 DF+GSH는 체중증가량을 감소시키고 혈중 지질대사를 개선하며 이에 따라 간의 무게와 간세포의 지방 축적이 감소시켜 NAFLD의 개선에 기여할 수 있을 것으로 생각되며, 특히 DF 단독으로 투여할 때 보다는 GSH를 병용투여할 때에 그 효과가 증대되는 것으로 보인다.

V. 結 論

고지방 식이로 유발된 비만 마우스 모델을 이



용하여 降脂丸(DF) 단독투여와 加味消滯丸(GSH)의 병용 투여에 따른 체중증가량, 혈중 지질대사 관련 지표와 간조직의 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DF, DF+GSH와 atorvastatin은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하였으며, 그 감소폭은 DF+GSH에서 더욱 현저하였다.
2. Total cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 낮은 수치를 보였으며, DF+GSH와 atorvastatin에서 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다.
3. 간장의 무게는 대조군에 비해 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 감소하였으나 DF+GSH에서만 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다.
4. 간세포의 지방축적은 대조군에 비하여 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 그 정도는 DF의 단독투여보다는 GSH를 병용투여하였을 때 더욱 현저하였다.
5. 혈중 ALT의 농도는 DF, DF+GSH와 atorvastatin의 모두에서 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났으나 DF+GSH에서만 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다.

결론적으로 DF는 체중증가량을 감소시키고 혈중 지질대사와 ALT를 개선하며 이에 따라 간의 무게와 간세포의 지방 축적을 줄임으로써 NAFLD의 개선에 기여할 수 있을 것으로 생각된다. DF 단독투여보다는 GSH를 병용투여하였을 때 그 효과가 증대되는 것으로 보인다.

Acknowledgement

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant

funded by the Korea government(MEST) (No. 2012R1A2A2A01004508).

參考文獻

1. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J of Hepatol.* 2005; 42(1): 132-138.
2. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001; 50: 1844 - 1850.
3. MGaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients.* 2013; 5: 1544-1560.
4. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Influence of dietary intake on non-alcoholic fatty liver disease in Korean. 2012: 1.
5. Reynoso E, Lavine JE. NAFLD: The role of exercise in treating NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol and Hepatol.* 2012; 9: 368-370.
6. Ye Ji Ahn, Ki Hyeon Yoon, Ju Heum Jo, Du Hyon Jang, Yang Sam Jung, Jong Hoon Kim, Byeong Chul Kim, Hoa Jun Seok, Jae Sang Yoo, Ja Ryong Ku, Michung Yoon, Soon Shik Shin. Gangjihwan Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High Fat Diet-Fed C57BL/6N Mice. *Kor. J. Herbology* 2014; 29(2): 47-54.
7. Yun Gil Yeong. 『Clinical Formula Science of Korean Medicine』. Seoul: Myeongbo Press, 1985: 387.
8. Kim TK, Jung WS, Park SW, Cho KH, Kim YS. Comparison of efficacy and safety between

- Chunghyul-dan(HH-333) and Atorvastatin(Lipitor[®]).
Kor J of Orient Int Med. 2003; 24(4): 837-845.
9. Prineas RJ, Folsom AR, Kaye SA. Central adiposity and increased risk of coronary artery disease mortality in older women. *Ann Epidemiol.* 1993; 3: 35-41.
 10. Park HS, Kim MW, Shin ES. Effect of weight control on hepatic abnormalities in obese patients with fatty liver. *J Korean Med Sci.* 1995; 10: 414-421.
 11. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut.* 2004; 53: 413-419.
 12. Park KS, Jang BK, Kwon KM, Chung WJ, Cho KB, Hwang JS, Ahn SH, Mun KC, Kim YH. Antioxidant status in nonalcoholic steatohepatitis. *Korea J Hepatol.* 2005; 11(2): 135-143.
 13. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterol.* 1998; 114: 842-845.
 14. Durazzo M, Belci P, Collo A, Grisoglio E, Bo S. Focus on Therapeutic Strategies of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Hepatol.* 2012; 2012: 464706.
 15. Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 221 - 229.
 16. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, et al. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: A follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74 - 80.
 17. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: An expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103 - 1109.