

## 급성 알코올 간독성을 유발한 생쥐에 있어서 으름 열매 추출물의 간 기능 보호효과

이상훈 · 송영선 · 이서연 · 김소영 · 고광석\*  
이화여자대학교 건강과학대학 식품영양학과

### Protective Effects of *Akebia quinata* Fruit Extract on Acute Alcohol-induced Hepatotoxicity in Mice

Sang Hoon Lee, Young Sun Song, Seo Yeon Lee, So Young Kim, and Kwang Suk Ko\*

Department of Nutritional Science and Food Management, College of Health Science, Ewha Womans University

**Abstract** We studied the effects of *Akebia quinata* fruit extract (AQ) on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. AQ (30-1,000 mg/kg body weight (BW) per day) was orally administered to the study group, once daily for 1 week. On the last day of AQ treatment, ethanol (6 mg/kg BW) was orally administered to induce acute liver injury. The AQ-treated group showed significantly lower levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, compared to the only ethanol-treated group (ETG). The glutathione level in the AQ-treated group elevated up to 20.6%, compared to that observed in the ETG. The mRNA expression of glutathione synthetic enzymes was also higher in the AQ-treated group, compared to the ETG. The AQ-treated group also exhibited lower levels of expression of NADPH oxidase 4 and tumor necrosis factor alpha mRNA. Thus, these results show that AQ treatment can be a potential method to reduce oxidative stress and inflammation in ethanol-treated mouse liver and also that AQ can be a useful therapeutic agent for acute alcohol-induced hepatotoxicity.

**Keywords:** *Akebia quinata*, acute alcohol-induced liver injury, glutathione, NADPH oxidase 4, tumor necrosis factor alpha

## 서 론

체내에 흡수된 과도한 에탄올은 대사과정에서 아세트알데하이드나 반응성이 높은 라디칼 등의 독성 대사산물을 형성한다(1). 에탄올에 의한 독성은 고지혈증, 지방간 및 간경변과 같은 간 기능의 이상을 유발하며, 만성적 간 조직의 구조 및 기능에 치명적인 손상을 가져오게 된다(2). 만성적인 알코올의 섭취는 지방산의 산화를 저해함으로써 혈중 중성지방의 농도를 높일 수 있고 결과적으로 지방간 원인이 될 수 있다(2). 이와 더불어 methionine의 대사 이상을 초래함으로써 강력한 항산화 작용을 나타내는 glutathione (GSH)의 생산을 억제하게 된다(3). 척추동물에서는 이러한 산화적 손상을 대비하여 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase 등의 항산화 효소를 분비하도록 체계화되어 있지만(3,4) 손상을 완벽하게 방지하기에는 충분하지 못하다(5). 즉, 이러한 산화적 스트레스가 숙주동물의 항산화 역량을 넘어서게 되면 간 손상, 간세포의 자멸사 혹은 괴사를 유발 하게 된다(6). 나아가 간에서 염증 반응을 일으킴으로써 간 내 대식세포인 Kupffer cell로부터 tumor necrosis factor alpha

(TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), interleukin-1 (IL-1) 및 interleukin-6 (IL-6) 등의 염증성 cytokine들이 분비되고, 이들은 간세포의 콜라겐의 침착을 유도하여 간세포의 섬유화를 촉진하게 된다(3,7). 이러한 염증 반응은 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)의 발현을 증가시키게 되며 다시 TNF- $\alpha$ 의 발현을 더욱 증가 시켜 간의 염증 반응을 가속화 시키며(8) 비정상적인 변이와 암을 유발 할 수 있다고 알려져 있다(9).

으름(*Akebia quinata* Decne)은 으름덩굴과(*Lardizabalaceae*) 으름속(*Akebia*)에 속하는 식물로 한의학에서 오래 전부터 한국을 비롯한 중국 그리고 일본에서 항염증 및 이뇨를 촉진하는 약재로 사용되어 왔다(10,11). 으름의 과피와 그 줄기에서 oleanolic acid, hederagenin, triterpene glycosides, norarjunolic acid 등의 배당체와 사포닌들을 함유하고 있다고 보고되었다(12,13). 으름 추출물의 유효성분 중 oleanane disaccharides은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 라디칼을 제거하는 효과를 보였고 인간 유래 lymphocytes에서 과산화수소로 유발된 DNA 손상을 억제하는 것으로 보고되었다(14). 그리고 으름 유래 사포닌이 HepG2 간암세포주에 대한 세포 독성 및 세포자살을 유도 할 수 있다는 항암 효과 가능성도 보고되고 있어(15) 으름 추출물의 건강기능성 식품으로의 활용이 기대 되고 있다. 하지만 현재까지의 기존 연구를 종합해 볼 때, 으름 추출물이 항산화, 항염증 그리고 항암효과를 나타내는 것으로 사료되고 있으나 그 효과들에 대한 분자생물학적 메커니즘이나 임상에서의 응용에 대한 연구는 미미하다. 특히 최근 현대인들에게 화두가 되고 있는 알코올로 유발된 만성 및 급성 간독성에 대한 간보호 효과의 생리학적 활성에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 대량의 알코올섭취에 따른 급성 간 손상

\*Corresponding author: Kwang Suk Ko, Department of Nutritional Science and Food Management, College of Health Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea  
Tel: 82-2-3277-6859  
Fax: 82-2-3277-2862  
E-mail: kko@ewha.ac.kr  
Received April 7, 2014; revised August 22, 2014;  
accepted August 29, 2014

동물 모델에서 으름 열매 추출물의 간 보호효과를 구명하고자 실시 하였다.

## 재료 및 방법

### 으름 열매 추출물

으름 열매 추출물은 건국대학교 식품생명과학부 식품영양학 연구실로부터 제공 받아 실험에 사용되었다. 으름 열매는 2013년 3월 4월 전라남도 지리산 지역에서 채취하여 추출에 이용되었다. 건조된 으름의 열매 1,000 g를 증류수 4 L와 혼합하여 섞어 shaking incubator (SI-600, Lab Companion, Daejeon, Korea)에 25°C, 24시간 진탕한 후 여과지로 여과하여 증류수에 대한 분획물을 얻었다. 이를 rotary vacuum evaporator (R-114, Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland)로 감압 농축 하였다. 농축된 시료를 -70°C 초저온냉동고(DF8715, Ilshin Co., Seoul, Korea)에 1시간 냉동시킨 후 동결건조기(FDS8508, Ilshin Co., Seoul, Korea)에 동결 건조 하여 최종 으름 추출물 110 g을 얻어 11%(w/w)의 수율을 나타내었다.

### 실험동물 및 시료채취

5주령 C57BL/6 수컷 생쥐(중양실험동물, Korea)를 1주일간 일정한 조건(기온 25±3°C, 습도 50%, 명암주기 12시간)에 적응시킨 후 체중이 22-25 g 범위의 동물을 본 실험에 사용하였으며 상품화된 실험용 생쥐 사료(22GJ30060, Cargill Agri Purina, Inc., Seongnam, Korea)와 음용수(1차 증류수)를 자유급여 하였다. 생쥐 5마리를 1군으로 Table 1같이 무작위 배치 하였다. 동일한 위관 강제투여의 스트레스를 부여하기 위해 대조군과 알코올 처리군은 증류수 0.1 mL/day를 투여하고 으름 열매 추출물은 30-1,000 mg/kg body weight (BW) 용량으로 매일 일정한 시간에 1주일간 위관강제투여를 하였다. 급성 알코올성 간독성을 유발 하기 위해 으름 추출물처리 마지막 날의 으름 최종 투여 6시간 후 6 mg/kg BW 용량의 에탄올을 상응하는 군들에 위관강제투여 하였다. 모든 실험동물은 에탄올 처리 시점부터 18시간 후 희생하여 생체 시료를 취하였다. 시료의 채취는 2% isoflurane (isoflurane, Piramal Inc., PA, USA)을 이용하여 1분간 마취 후 회복하여 heparin (H3393, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 처리한 주사기를 이용하여 대정맥에서 혈액을 채취하였으며 간 또한 적출하였다. 채취한 혈액은 상온에서 1,200×g, 20분간 원심분리 후 혈장을 분리하여 분석에 이용하였으며, 간 조직은 생리식염수로 수세 후 중량 측정 및 분석에 사용 되었다. 모든 실험동물의 취급 및 사후 처리는 이화여자대학교 동물실험윤리위원회의 기준을 준수하여 시행되었다.

### 간 조직 형상 및 간 조직 내 지방구의 상대 정량

간 조직의 광학현미경적 변화를 관찰하기 위하여 실험에 사용된 모든 생쥐의 간 소엽을 절제하여 10% 포르말린에 고정시킨 후 통상적인 방법으로 탈수와 청명과정을 거쳐 파라핀 포매하였

다. 포매한 조직은 5 µm 두께로 박질편을 만든 후 Hematoxylin-Eosin (H&E)으로 염색하여 광학현미경으로 간 조직의 손상 정도를 관찰하였다. 조직학적 검경은 각 군당 조직샘플 4개를 무작위로 선택하여 이중 맹검으로 평가하였다. 선택된 조직은 CCD color camera (MoticamPro, Motic, Hong Kong, China)와 광학현미경 (AE31, Motic, Hong Kong, China)을 이용하여 디지털 image를 촬영하였으며 image 분석 system (image-Pro Plus, Media Cybernetics, MD, USA)을 이용하여 대조군의 지방구 면적을 기준으로 처리군의 지방구 면적을 상대적으로 분석 하였다.

### Alanine aminotransferase와 aspartate aminotransferase 활성 측정

간 손상 지표로 사용되는 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)의 활성은 ALT와 AST kit (AM101-L, Asan Pharm. Co. LTD., Hwaseong, Korea)를 사용하여 비색정량으로 계산하였다.

### Glutathione 농도 측정

GSH의 함량은 GSH reductase (G3664, Sigma-Aldrich, MO, USA) 를 이용하여 산화된 모든 GSH를 환원하여 시료 내 총 GSH를 측정하였다(16, 17). 먼저 간조직 100 mg에 1 mL의 식염수를 가한 후 균질 및 원심 분리하여 회수한 상층액 0.4 mL은 단백질의 농도를 측정하였으며(18), 나머지 0.4 mL은 0.6 M perchloric acid (7601-90-3, Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan)로 단백질을 제거한 후 GSH 분석에 사용되었다. GSH의 함량은 검체 또는 GSH 표준액(G4251, Sigma-Aldrich) 0.1 mL을 2.5 mL의 반응용액(0.15 mM NADPH (N6505, Sigma-Aldrich), 0.1 mM 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (D8130, Sigma-Aldrich), 50 mM NaPO<sub>4</sub> (7558-79-4, Junsei Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), 1.5 mM EDTA (E5124, Sigma-Aldrich)과 0.1 mL의 GSH reductase (10 units/mL)와 동시에 혼합 한 후 412 nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하여 구하고 표준 GSH 검량선으로부터 GSH의 농도를 간조직 단백질 mg당 µmole로 나타내었다.

### Glutathione synthesizing enzymes, tumor necrosis factor-alpha, NADPH oxidase 4의 mRNA levels

간조직에서 total RNA 분리는 Trizol 용액(Trizol, Life Technologies Inc., NY, USA)을 이용하였으며 mRNA의 발현 수준은 quantitative real-time PCR 방법으로 측정하였다. cDNA는 first strand cDNA synthesis kit (K1621, Thermo Scientific, MA, USA)로 합성하였고 Maxima SYBR Green qPCR Master Mixes (K0222, Thermo Scientific)를 사용하여 PCR (Rotor-Gene-Q, Qiagen, Hilde, German)을 실시하였다. PCR을 위한 primer는 다음과 같이 사용되었다.

Glutamate-cysteine ligase modifier subunit (NM\_008129, GCLM): 5'-TCCTGCTGTGTGATGCCACCAG-3', 5'-GCTTCCTGGAAACT-TGCCTCAG-3'; glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (NM\_

**Table 1. Treatment of *Akebia quinata* fruit extract and ethanol**

| Treatment  | Control (n=5) | EtOH (n=5) | AQ (n=5) | AQE1 (n=5) | AQE2 (n=5) | AQE3 (n=5) | AQE4 (n=5) |
|--|---------------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|
| Extract of <i>Akebia quinata</i> concentration <sup>1)</sup> | -             | -          | 30       | 30         | 100        | 400        | 1000       |
| EtOH Concentration <sup>1)</sup>                             | -             | 6.00       | -        | 6.00       | 6.00       | 6.00       | 6.00       |

<sup>1)</sup>Dose (mg/kg body weight)

**Table 2. Effects of *Akebia quinata* fruit extract on body weight, liver weight and ratio of liver weight to body weight in experimental groups**

| Treatment               | Control (n=5)           | EtOH (n=5)              | AQ (n=5)                | AQE1 (n=5)              | AQE2 (n=5)              | AQE3 (n=5)              | AQE4 (n=5)              |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Body weight (g)         | 21.59±1.23 <sup>b</sup> | 22.00±1.27 <sup>b</sup> | 21.06±0.88 <sup>b</sup> | 20.98±0.42 <sup>b</sup> | 22.02±0.90 <sup>b</sup> | 23.39±1.02 <sup>a</sup> | 21.61±1.11 <sup>b</sup> |
| Liver weight (g)        | 0.83±0.08 <sup>c</sup>  | 1.00±0.08 <sup>ab</sup> | 0.82±0.02 <sup>c</sup>  | 0.91±0.03 <sup>b</sup>  | 0.95±0.04 <sup>ab</sup> | 1.00±0.06 <sup>ab</sup> | 0.92±0.08 <sup>b</sup>  |
| L.W./B.W. <sup>1)</sup> | 3.83±0.30 <sup>c</sup>  | 4.57±0.27 <sup>a</sup>  | 3.92±0.13 <sup>c</sup>  | 4.36±0.08 <sup>ab</sup> | 4.31±0.26 <sup>ab</sup> | 4.26±0.12 <sup>b</sup>  | 4.26±0.24 <sup>b</sup>  |

Results are presented as mean±standard deviation.

<sup>1)</sup>Ratio of liver weight to body weight

<sup>a-c</sup>Within rows, means with different superscripts are significantly different ( $p<0.01$ ).

Abbreviations: EtOH, 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQE1, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE2, 100 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE3, 400 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE4, 1,000 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH.

010295, GCLC): 5'-ACACCTGGATGATGCCAACGAG-3', 5'-CC TCCATTGGTCGGAAGCTCTAC-3'; GSH synthase (NM\_0008180, GSS): 5'-GAAGAAGCTGGCAAAGCAGGC-3', 5'-TGGGTACTG-GTGGAGGGGAAA-3'; tumor necrosis factor-alpha(NM\_001278601, TNF- $\alpha$ ): 5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3', 5'-GCCATAGA ACTGATGAGAGGGAG-3'; NADPH oxidase 4 (NM\_015760, NOX4): 5'-CGGGATTTGCTACTGCCTCCAT-3', 5'-GTGACTCCT-CAAATGGGCTTCC-3'. PCR 결과로부터 각각의 유전자의 상대적 인 정량분석은  $\beta$ -actin에 대한 조사하고자 하는 유전자의 PCR 생성물의 상대적인 비율로 계산하였다(19).

#### 통계분석

실험결과는 SAS software (ver. 9.3)의 one-way analysis of variance (ANOVA)을 이용하여 유의성 5% 이내에서 검증 하였으며, 평균 간 검정은 Duncan's multiple range test로 유의적 차이를 검증 하였다.

## 결과 및 고찰

#### 체중 및 간 중량

급성 및 만성 알코올에 의한 간손상에 대한 증상은 다양하게 나타나지만 대표적으로 지방간을 들 수 있다(20,21). 알코올에 의한 간손상은 지방간으로 간의 부피와 중량을 증가시킬 수 있다는 보고는 여러 연구를 통해 알려져 있다(22-25). 알코올의 섭취로 인한 지방간 및 간손상 유발은 여러 생화학적 기작이 관련되어 있는데(26-29) 그 중 알코올은 세포내 reactive oxygen specise (ROS)를 증가시키고 미토콘드리아의 손상과 지질의 과산화(lipid peroxidation)에 영향을 미치며 결과적으로 세포막에 손상을 준다 고 알려져 있다(30). 이때 형성된 acetaldehyde는 tubulin등에 결합함으로써 세포 내 물질을 세포 밖으로 배출시키는 작용을 억제 시키며 세포 내 축적된 단백질, 지질, 수분 및 세포질 등은 간세포를 팽창시키는 결과를 초래한다. 이는 전형적인 간손상의 특징으로 보고되고 있다(31). 따라서 체중에 대한 간 중량의 비율은 간손상 여부의 간접적인 지표로 사용 될 수 있다. 본 연구에서의 실험군의 체중과 간 중량 및 체중에 대한 간 중량의 비율을 Table 2에 나타내었다. 체중의 경우 AQE3 그룹의 체중이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높았다. 하지만 으름 열매 추출물을 급여하는 실험 기간 동안 비정상적인 체중의 증가와 감소는 관찰되지 않았다(data not shown). 체중에 대한 상대적인 간 중량의 경우는 EtOH 그룹이 가장 높은 수치를 나타내어 알코올의 처리가 상대적 인 간의 중량을 유의적으로 상승시키는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 알코올 간독성을 유발한 생쥐에서 체중에 대한

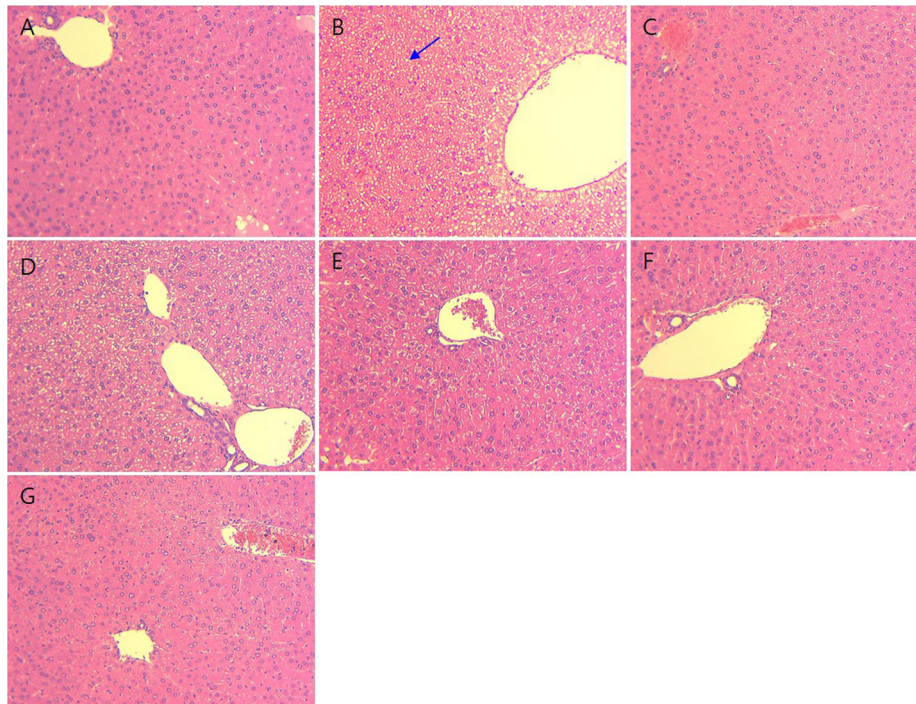
상대적인 간 중량이 유의적으로 증가 하였다고 보고한 Letteron 등(32) 및 Yin 등(33)의 결과와도 일치 하였다. 결과적으로 본 연구에서도 경구 알코올 처리가 생쥐의 지방간 및 간 손상을 유도한 것으로 판단된다. 또한 으름 열매 추출물 처리 및 알코올 처리군의 경우는 처리군 AQE3과 AQE4 그룹의 체중 대비 간 중량이 대조군에 비해 유의적으로 감소해 간 보호의 효과를 간접적으로 나타내는 것으로 분석되었다.

#### 간 조직 형상 및 간 조직내 지방구의 상대 정량

적절한 간 조직으로부터 H&E 염색을 통해 간조직의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 광학현미경 관찰 결과 지방구를 제외 한 부분이 붉게 염색되었으며, 핵은 보라색으로 나타났다. EtOH 만 단독 처리한 군에서 간 조직내 지방 축적이 유발된 것을 관찰 할 수 있었는데 이는 Ying 등(33)과 동일한 결과로 EtOH군에서 알코올성 간독성이 유발되었음을 알 수 있었다. 한편 으름열매 추출물 처리군에서는 EtOH 만 단독 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 간조직 내 지방의 축적이 감소하는 것을 광학현미경 관찰로 확인 하였다. 대조군에 대한 상대적인 지방구의 면적은 EtOH 단독처리한 군은 953±78%, AQ군은 110±5%을 나타내었으며 EtOH와 AQ 처리군의 경우 AQE1은 987±188%, AQE2은 724±111%, AQE3은 434±55%, AQE4은 132±30%의 수치를 나타내었다(Table 3). 특히, 으름 추출물 처리 최고농도인 1,000 mg/kg B.W의 농도에서는 간세포의 괴사 및 지방 축적이 알코올로 인한 간독성이 크게 완화 되는 것으로 관찰되었다.

#### Alanine aminotransferase와 aspartate aminotransferase 활성도

알코올성 간손상을 입은 실험 동물의 간 기능 회복에 대한 으름 열매 추출물의 효과는 혈중 ALT, AST 활성을 통해 조사 하였다(Table 4). 알코올만 처리한 EtOH 그룹의 경우 ALT, AST 각각 37.42±12.48 IU/L, 38.24±16.08의 수치를 보여 실험군내에서 유의적으로 가장 높은 수치를 나타내었다( $p<0.001$ ). 일반적으로 알코올로 유발된 급성 간독성을 보이는 간에서는 ALT와 AST의 활성이 증가된다고 보고된다(16,32). 본 연구에서도 EtOH 그룹은 알코올로 인한 간독성이 발생한 것으로 판단된다. 반면 AQ 처리군의 ALT, AST 수치의 경우는 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다. AQE2, AQE4 그룹의 ALT의 경우 대조군과 유의적 차이를 보이지 않아 알코올 처리를 통해 유발된 간독성이 완화되는 것으로 분석되었다. AST 수치의 경우도 으름 처리군이 알코올만 처리한 실험군에 비해 수치가 낮아 지는 경향을 나타내어 으름 열매 추출물의 간 보호 효과를 나타낼 가능성을 보였다.



**Fig. 1. Histologic changes in *Akebia quinata* (AQ) fruit extract & EtOH treated mouse livers.** (A-G) (X 200) show H&E staining of mouse livers and are representative micrographs that were randomly selected in each groups. (A) Control, (B) EtOH only (6 mg/kg B.W), (C) AQ fruit extract only (30 mg/kg B.W) treatment, (D) AQ fruit (30 mg/kg B.W) and EtOH (6 mg/kg B.W) treatment, (E) AQ fruit (100 mg/kg B.W) and EtOH (6 mg/kg B.W) treatment, (F) AQ fruit (400 mg/kg B.W) and EtOH (6 mg/kg B.W) treatment, (G) AQ fruit (1,000 mg/kg B.W) and EtOH (6 mg/kg B.W) treatment. The blue arrow indicates a fat drop.

**Table 3. Effects of *Akebia quinata* fruit extract on lipid deposition of mouse livers in experimental groups**

| Treatment                  | Control (n=5)          | EtOH (n=5)           | AQ (n=5)            | AQE1 (n=5)            | AQE2 (n=5)            | AQE3 (n=5)           | AQE4 (n=5)           |
|----------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Relative lipid drop area % | 100±0.21% <sup>a</sup> | 953±78% <sup>d</sup> | 110±5% <sup>a</sup> | 987±188% <sup>d</sup> | 724±111% <sup>c</sup> | 434±55% <sup>b</sup> | 132±30% <sup>a</sup> |

Results are presented as mean±standard deviation.

<sup>a-d</sup>Within rows, means with different superscripts are significantly different ( $p<0.001$ ).

Abbreviations: EtOH, 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQE1, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE2, 100 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE3, 400 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE4, 1,000 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH.

**Table 4. Effects of *Akebia quinata* fruits extract on alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase level in experimental groups**

| Treatment  | Control (n=5)            | EtOH (n=5)               | AQ (n=5)                | AQE1 (n=5)               | AQE2 (n=5)                | AQE3 (n=5)               | AQE4 (n=5)               |
|------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ALT (IU/L) | 24.32±3.91 <sup>cd</sup> | 37.42±12.48 <sup>a</sup> | 22.62±3.36 <sup>d</sup> | 32.47±5.43 <sup>ab</sup> | 29.24±5.15 <sup>bc</sup>  | 31.61±5.24 <sup>ab</sup> | 30.14±3.75 <sup>bc</sup> |
| AST (IU/L) | 24.35±3.52 <sup>b</sup>  | 38.24±16.08 <sup>a</sup> | 24.25±2.62 <sup>b</sup> | 32.74±7.53 <sup>ab</sup> | 30.83±10.43 <sup>ab</sup> | 30.86±6.40 <sup>ab</sup> | 31.88±7.09 <sup>ab</sup> |

Results are presented as mean±standard deviation.

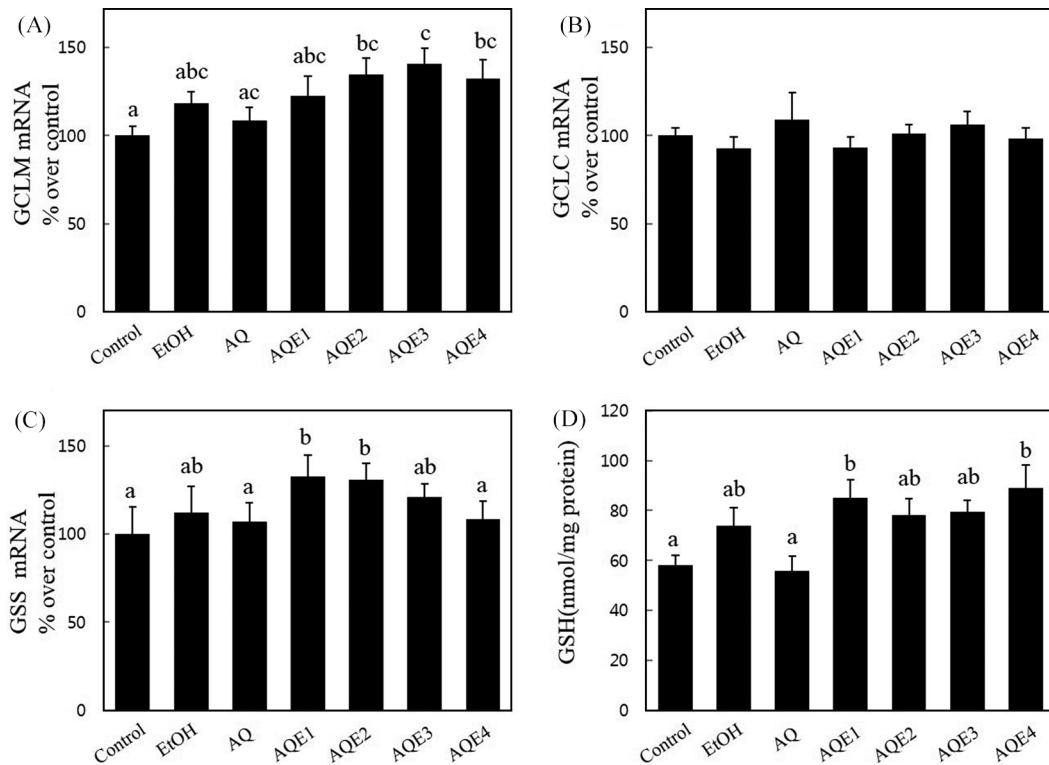
<sup>a-d</sup>Within rows, means with different superscripts are significantly different ( $p<0.01$ ).

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; EtOH, 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQE1, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE2, 100 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE3, 400 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE4, 1,000 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH.

**간 조직내 glutathione synthetic enzyme의 mRNA 발현과 glutathione level**

항산화 및 제독 기능을 가지고 있는 GSH는 만성 간질환에 의해 그 농도가 감소 할 뿐만 아니라 노화, 담즙분비이상, 내독소 혈증, 알코올성 간질환 등의 다양한 병변에서 GSH의 세포내 항상성의 심각한 이상을 초래한다(34-38). 본 연구에서는 으름 열매 추출물이 알코올로 유발된 간독성에 대한 간보호 효과를 알아보고자 간 조직내 GSH synthetic enzyme의 mRNA 발현 정도와

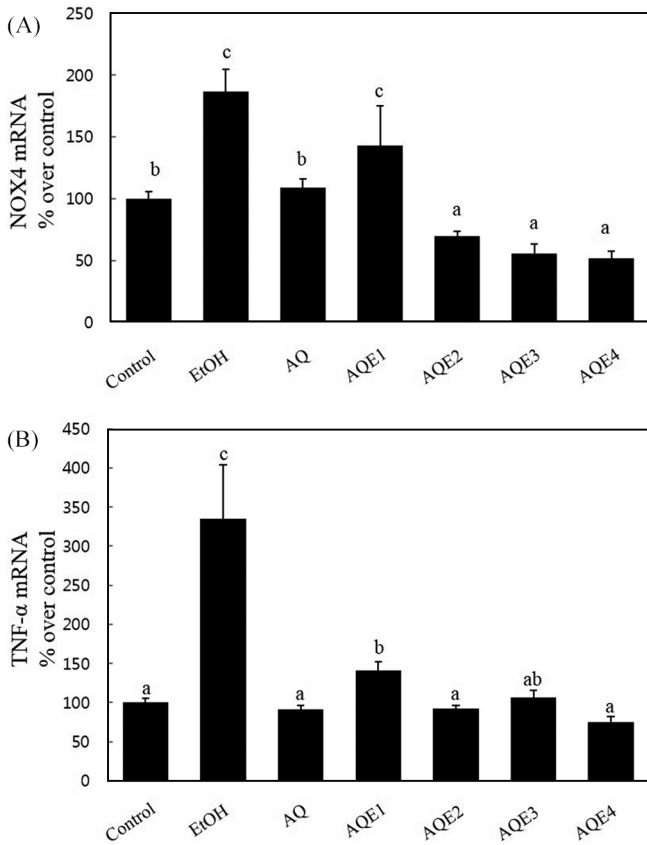
GSH 농도를 분석 하였으며 그 발현 정도를 Fig. 2에 나타내었다. AQ 그룹의 경우의 경우 대조군의 비해 GCLM mRNA의 발현을 증가 시키는 것으로 분석되었다(Figure 2-A). EtOH 그룹에서도 GCML의 mRNA 발현은 대조군보다 높게 발현되는 경향을 보였지만 통계적 유의차는 없었다. 으름 열매 추출물의 농도가 100 mg/kg BW 이상일 때 대조군과 EtOH 그룹보다 GCLM mRNA 발현량이 증가하는 경향을 나타내었다. GSS mRNA 발현의 경우는 AQE1과 AQE2 그룹에서 높게 발현되는 경향을 보였다. 하지



**Fig. 2. Effects of *Akebia quinata* (AQ) fruit extract and EtOH on relative mRNA expression level of glutathione synthetic enzymes and glutathione (GSH) concentration in mouse livers.** (A), relative mRNA expression of glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM); (B), relative mRNA expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC); (C), relative mRNA expression of glutathione synthase (GSS); (D), GSH level in mouse livers. Abbreviations: EtOH, 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQE1, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE2, 100 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE3, 400 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE4, 1,000 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH. <sup>a-c</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

만 EtOH 그룹도 AQE1과 AQE2 그룹과 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. GSH 합성에서 속도결정 단계를 촉매 하는 gamma-glutamyl cysteine ligase는 heterodimer 단백질로 catalytic subunit과 modifier subunit으로 구성된다(39). GSH의 농도는 주로 catalytic subunit의 변화와 관련이 있다고 보고 되고 있지만(40) 본 연구에서 GCLC mRNA 발현은 대조군 및 모든 처리군에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 GSH의 항상성은 GSH의 신생합성 외에 소모 반응 및 시간적 차이에 의해서도 조절된다는 점을 고려해야 할 것으로 판단된다. Figure 2(D)는 으름 열매 추출물의 처리가 급성 알코올 간독성을 유발한 마우스의 간 조직내 GSH 농도에 미치는 영향을 나타내었다. 대조군과 비교하여 EtOH 그룹과 AQE1, AQE4에서 GSH 농도가 증가 하는 것으로 분석되었다. 하지만 으름 열매 추출물만 처리한 AQ 그룹에서는 GSH의 농도가 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. Vogt(41)등은 급성 알코올 간독성을 유발한 생쥐의 간에서 GSH 농도와 GSH 회복에 대한 보고를 하였다. 연구 결과에 따르면 생쥐의 연령에 따라 알코올성 급성 간독성 상태에서 GSH 농도는 연령과 알코올을 급여 후 시간에 따라 차이를 보인다고 했으며 간독성 유발 후 초기 6시간 이내는 GSH 농도가 낮아지며 알코올성 급성 간독성을 유발한 후 24시간이 지난 후에는 대조군의 경우 보다 높은 GSH 농도를 나타낸다고 보고 하였다. 본 연구에도 알코올만 처리한 경우에도 GSH 농도를 증가 시키는 결과를 보였는데 이는 알코올로 인한 산화적 스트레스에 대한 GSH 고갈 및 회복 작용으로 GSH의 수준을 증가시키는 것으로 판단된다. 본 실험에서 급성 알코올 독성 유발 후 18시간이 지난 후 간

조직내 GSH 농도라는 점은 앞선 연구의 결과를 고려할 때 간조직에서의 GSH 농도가 외부 스트레스에 대한 방어적인 기전을 통해 어느 정도 회복 되는 시점이라고 판단된다. 특히 본 연구에서 으름 열매 추출물의 처리는 농도 의존적인 경향을 보이지 않았지만 급성 알코올 간독성에서 GSH 농도를 증가시킨다고 판단된다. 만성 간질환의 경우 대부분 산화적 스트레스의 증가가 수반되며 바이러스성 간 질환, 자가면역적 간 질환, 만성적인 알코올의 섭취, 비 알코올성 지방간 등 다양한 병증의 원인이 존재 하지만 공통적으로 손상된 간 조직에서는 항산화기능을 가진 GSH의 고갈이 관찰된다(42). 이와 같이 간 조직의 손상을 줄 수 있는 산화적 스트레스에 대한 보호 기작은 잘 알려진 바와 같이 항산화능력이 주요하다고 할 수 있다(43). 그 중에서도 GSH의 직접적인 전구 물질인 S-adenosylmethionine의 경우 투여는 만성 알코올 섭취로 인한 손상된 간 조직내에서 GSH의 농도를 회복시키는 것으로 보고되고 있다(44,45). 다시 말해 알코올로 인한 만성 또는 급성 간질환의 경우 간 조직내 산화스트레스를 효과적으로 제거 할 수 있는 항산화능력의 향상으로 손상된 간 조직을 보호 할 수 있다고 정리 할 수 있다. 본 연구에서는 생쥐에 대한 으름 열매 추출물의 경구 투여는 알코올로 유발된 급성 간독성에서 항산화 기능을 향상 시킬 수 있는 가능성을 보여주었지만 만성적인 알코올 섭취로 인한 간 손상 경우에도 GSH의 농도를 회복시키는 것이 간 보호에 있어 중요한 역할을 하기 때문에 으름의 추출물의 경구 투여는 만성적이 알코올 섭취로 인한 간 조직에서 항산화 능력을 향상 시킬 수 있는 가능성이 있을 것으로 판단된다.



**Fig. 3. Effects of *Akebia quinata* (AQ) fruit extract and EtOH on relative mRNA expression level of NADPH oxidase 4 (NOX4) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in mouse livers.** Abbreviations: EtOH, 6 mg of EtOH/kg B.W; AQ, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W; AQE1, 30 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE2, 100 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE3, 400 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH; AQE4, 1,000 mg of AQ fruits extract/kg B.W with EtOH. \*<sup>a-c</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

**NADPH oxidase 4 mRNA 발현 측정**

NADPH oxidase (NOX)는 다양한 자극에 반응하여 활성산소기 (reactive oxygen species; ROS)를 발생시키는 효소로서 NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 가 존재하며 간 내에서 NOX system에 의해 발생하는 산화스트레스는 알코올성 간질환, 만성 C형 간염, 철분 및 담즙 정체 간손상 등 여러 가지 간질환과 간섬유화 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(46). 최근 연구에 따르면 따르면 NOX4의 억제와 간섬유화와 간세포의 apoptosis 억제와 관련이 있다는 연구결과가 보고되고 있다(47,48). 본 연구에서의 급성 알코올 간독성시 생쥐 간조직에서의 NOX4 mRNA 발현 정도를 분석한 결과를 Fig. 3(A)에 나타내었다. EtOH 그룹과 AQE1 그룹에서 NOX4의 mRNA 발현이 유의적인 증가를 나타내었다. 반면, AQE2, AQE3, AQE4H의 그룹에서는 대조군 보다 유의적으로 낮은 수준의 NOX4 mRNA 발현 수준을 보여 으름 열매 추출물 농도 100 mg/kg B.W 이상의 농도에서 산화 스트레스 감소 효과를 나타내었다.

**Tumor necrosis factor-alpha mRNA 발현 측정**

만성적 또는 급성의 알코올의 섭취는 장벽의 손상을 통해 장 내독소 침투를 촉진 시킬 수 있고 이는 Kupffer cell을 활성화 시

켜 ROS의 생성과 여러 염증유발 cytokine의 생성을 증가 시킨다고 보고되었다(49,50). 특히 여러 연구에 따르면 급성 및 만성적 알코올의 섭취가 간조직에서 대표적 proinflammatory인 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)의 발현을 유의적으로 증가 시킨다고 보고 하였다(51-53). 따라서 본 연구에서 으름 열매 추출물의 처리가 알코올 처리로 인한 간 조직의 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 대표적인 염증 반응 지표인 TNF-α의 mRNA 발현 수준을 분석하였다(Fig. 3(B)). 본 연구에서도 EtOH 그룹의 TNF-α mRNA의 발현 정도는 대조군에 대비해 약 335% 증가해 알코올로 인한 간독성 및 염증 반응이 진행되었음을 확인할 수 있었다. 반면 모든 으름 열매 추출물- EtOH 처리 그룹에서 TNF-α mRNA의 발현 정도는 EtOH 그룹에 비해 유의적으로 큰 폭으로 감소(대조군 대비 75.1-141.3%)해 으름 열매 추출물 처리가 알코올로 유발된 급성 염증 반응을 감소시킬 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

**요 약**

생쥐에서의 으름의 열매 추출물의 경구 투여가 알코올로 인한 급성 간독성 상태에서 간보호 효과에 대한 영향을 조사 하였다. 즉, 생쥐 (C57BL/6)에게 1주간 으름 열매 추출물을 투여 하고 희생 전 알코올의 경구 투여를 통해 급성 알코올 간독성을 유발한 후 간 조직 형상, 간 기능 지표(ALT, AST), 간 세포내 GSH 합성 효소(GCLM, GCLC, GSS)의 mRNA 발현량, GSH 농도의 측정, 산화 스트레스 지표인 NOX4의 mRNA 발현량과 염증 반응 지표인 TNF-α의 mRNA 발현량을 조사 하였다. 그 결과, 으름 열매 추출물의 경구 투여는 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 조직내 지방의 축적을 완화 하였고, 혈청 AST, ALT 수치를 개선하였으며, 간조직 내 항산화 물질인 GSH의 농도를 증가 시켰다. 더불어 활성산소기를 생성하는 NOX4의 mRNA 발현을 억제 하는 것으로 분석되었으며 염증 반응 지표인 TNF-α의 mRNA 발현도 억제 하는 것으로 분석되었다. 따라서 으름의 열매 추출물은 알코올로 유발된 산화 스트레스, 염증 반응에 대한 간보호 효과 가능성을 나타내는 것으로 판단된다.

**감사의 글**

본 연구는 2013년도 정부(농림수산식품부)의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원 연구비(112123-03-1-HD040) 지원을 받아 연구되었으며, 으름추출물을 제공해 주신 건국대학교 안정희 교수님에게 감사를 드립니다.

**References**

1. Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK. Research advances in ethanol metabolism. *Pathol. Biol.* 49: 676-682 (2001)
2. Rouach H, Clement M, Ofanelli MT, Janvier B, Nordmann J, Nordmann R. Hepatic lipid peroxidation and mitochondrial susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation and withdrawal. *Biochem. Biophys. Acta.* 753: 439-444 (1983)
3. Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, Uesugi T, Mason RP, Connor HD, Dikalova A, Kadiiska M, Thurman RG. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J. Biol. Chem.* 276: 36664-36672 (2001)
4. Moncade C, Torres V, Varghese G, Albano E, Israsel Y. Ethanol derived immuno reactive species formed by radical mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 46: 786-791 (1994)
5. Simic MG. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in

- mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202: 377-386 (1988)
6. Lu SC, Mato JM. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23: s73-s77 (2008)
  7. McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease IV. dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287: 497-502 (2004)
  8. Camandola S, Scavazza A, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E, Azzi A, Poli G. Biogenic 4-hydroxy-2-nonenal activates transcription factor AP-1 but not NF-kappa B in cells of the macrophage lineage. *Biofactors* 6: 173-179 (1997)
  9. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronicinflammatory processes. *Mutat. Res.* 591: 110-122 (2005)
  10. Ikuta A. Saponins and triterpenes from callus tissues of *Akebia trifoliata* and comparison with the constituents of other Lardizabalaceous callus tissues. *J. Nat. Prod.* 58: 1378-1383 (1995)
  11. Choi JW, Jung HJ, Lee KT, Park HJ. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and saponins obtained from the stem of *Akebia quinata*. *J. Med. Food* 8: 78-85 (2005)
  12. Higuchi R, Kawasaki T. Pericarp saponins of *Akebia quinata* Decne. I. Glycosides of hederagenin and oleanolic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 24: 1021-1032 (1976)
  13. Ikuta A, Itokawa H. A triterpene from *Akebia quinata* callus tissue. *Phytochemistry* 27: 3809-3810 (1988)
  14. Jung HJ, Lee CO, Lee TK, Choi JW, Park HJ. Structure - activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 744-747 (2004)
  15. Kang SH, Kang JS, Jeong WS. Cytotoxic and apoptotic effects of saponins from *Akebia quinata* on HepG2 hepatocarcinoma cells. *Korean. J. Food. Preserv.* 17: 311-319 (2010)
  16. Ellman GL. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77 (1959)
  17. Tietze F. Disulfide reduction in rat liver. I. Evidence for the presence of nonspecific nucleotide-dependent disulfide reductase and GSH-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. *Arch. Biochem. Biophys.* 138: 177-188 (1970)
  18. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
  19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Methods 25: 402-408 (2001)
  20. Umulis DM, Gurmen NM, Singh P, Fogler HS. A physiologically based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings. *Alcohol* 35: 3-12 (2005)
  21. Cha YS, Sachan DS. Acetylcarnitine-mediated inhibition of ethanol oxidation in hepatocytes. *Alcohol* 12: 289-294 (1995)
  22. Israel Y, Robert SB, Hector O. Liver cell enlargement induced by chronic alcohol consumption: studies on its causes and consequences. *Clin. Biochem.* 15: 189-192 (1982)
  23. Kwo PY, Ramchandani VA, O'Connor S, Amann D, Carr LG, Sandrasegaran K, Kopecky KK, Li TK. Gender differences in alcohol metabolism: Relationship to liver volume and effect of adjusting for body mass. *Gastroenterology* 115: 1552-1557 (1998)
  24. Degraee P, Demizieux L, Gresti J, Chardigny JM, Sbdio JL, Clouet P. Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed *trans*-10, *cis*-12-linoleic acid. *FEBS. Lett.* 546: 335-339 (2003)
  25. Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, Odell MM, Bauer RL, Ren HP, Haugen HS, Yeh MM, Fausto N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 3389-3394 (2005)
  26. Gao B, Bataller R. Gastroent. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 141: 1572-1585 (2011)
  27. Stickel F, Seitz HK. Alcoholic steatohepatitis. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24: 683-693 (2010)
  28. Beier JL, McClain CJ. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease. *J. Biol. Chem.* 39: 1249-1264 (2010)
  29. Zeng T, Xie KQ. Ethanol and liver: recent advances in the mechanisms of ethanol-induced hepatosteatosis. *Arch. Toxicol.* 83: 1075-1081 (2009)
  30. Espin N, Lima, V, Lieber CS, Garro AJ. *In vitro* and *in vivo* inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. *Carcinogenesis* 9: 761-766 (1988)
  31. Wondergem R, Davis J. Ethanol increases hepatocyte water volume. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18: 1230-1236 (1994)
  32. Lettron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to *in vivo* lipid peroxidation in mice. *J. Hepatol.* 24: 200-208(1996)
  33. Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 117: 942-952 (1999)
  34. Abdellah M, Demelliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 737-743 (2001)
  35. Ko KS, Yang H, Nouredin M, Iglesia-Ara A, Xia M, Wagner C, Luka Z, Mato JM, Lu SC. Changes in S-adenosylmethionine and GSH homeostasis during endotoxemia in mice. *Lab Invest.* 88: 1121-1129 (2008)
  36. Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019: 346-349 (2004)
  37. Videla LA, Valenzuela A. Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelations and pathological implications. *Life Sci.* 31: 2395-2407 (1982)
  38. Sun S, Zhaing H, Xue B, Wu Y, Wang J, Yin Z, Luo L. Protective effect of glutathione against lipopolysaccharide-induced inflammation and mortality in rats. *Inflamm. Res.* 55: 504-510 (2006)
  39. Dalton TP, Dieter MZ, Yang Y, Shertzer HG, Nebert DW. Knock-out of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 324-329 (2000)
  40. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb. J.* 13: 1169-1183 (1999)
  41. Vogt BL, Richie JP Jr. Glutathione depletion and recovery after acute ethanol administration in the aging mouse. *Biochem. Pharmacol.* 73: 1613-1621 (2007)
  42. Medina J, Moreno-Otero R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs* 65: 2445-2461 (2005)
  43. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Pathol.* 163: 1301-1311 (2003)
  44. Vendemiale G, Altomare E, Trizio T, Grazie CL, Padova CD, Salemo MT, Carrieri V, Albano O. Effects of oral S-adenosyl-L-methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 24: 407-415 (1989)
  45. Mato JM, Cmara J, Fernandez de Paz J, Caballera L, Coll S, Caballero A, Garca-Buey L, Beltrn J, Benita V, Caballera J, Sol R, Moreno-Otero R, Barroa F, Martn-Duce A, Correa JA, Pars A, Barroa E, Garca-Magaz I, Puerta JL, Moreno J, Boissard G, Ortiz P, Rods J. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo- controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J. Hepatol.* 30: 1081-1089 (1999)
  46. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87: 245-313 (2007)
  47. Jiang JX, Chen X, Serizawa N, Szyndralewicz C, Page P, Schrder K, Brandes RP, Devaraj S, Trk NJ. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 53: 289-296 (2012)
  48. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic

- stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112: 1383 - 1394 (2003)
49. Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 108: 218-224 (1995)
50. Thurman RG, Bradford BU, Imuro Y, Knecht KT, Arteel GE, Yin M, Connor HD, Wall C, Raleigh JA, Frankenberg MV, Adachi Y, Forman DT, Brenner D, Kadiiska M, Mason RP. The role of gut-derived bacterial toxins and free radicals in alcohol-induced liver injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: S39-S50 (1998)
51. Ji C, Deng Q, Kaplowitz N. Role of TNF-alpha in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology* 40: 442-451 (2004)
52. Zhao XJ, Dong Q, Bindas J, Piganelli JD, Magill A, Reiser J, Kolls JK. TRIF and IRF-3 binding to the TNF promoter results in macrophage TNF dysregulation and steatosis induced by chronic ethanol. *J. Immunol.* 181: 3049-3056 (2008)
53. Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Nath B, Hritz I, Kodys K, Catalano D, Kurt-Jones E, Mandrekar P, Szabo G. Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology* 53: 649-660 (2011)