

Protective Effects of Curcumin on CCl₄-Induced Hepatic Fibrosis with High Fat Diet in C57BL/6 Mice

Seung-Joo Jekal¹, Byung Woon Min², and Ho Park¹¹Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 54538, Korea²Department of Biomedical Laboratory Science, Hanlyeo University, Gwanyang 57764, Korea

C57BL/6 마우스에서 고지방 식이와 CCl₄로 유발한 간섬유증에 미치는 커큐민의 보호효과

제갈승주¹, 민병운², 박 호¹¹원광보건대학교 임상병리과, ²한려대학교 임상병리학과

Curcumin, a major polyphenolic compound of turmeric, is well known to prevent non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity. The aim of the study was to investigate the effect of curcumin on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in obese mice. CCl₄ was administered in mice fed a normal diet (ND) or a high fat diet (HFD) for 7 weeks together with or without curcumin. It was conducted to examine for metabolic profiles, adipocyte size, and liver fibrosis by serum biochemistry, histology and immunohistochemistry. Also, Apoptosis of hepatic cells was determined by the TUNEL method. Treatment with curcumin significantly lowered the body weight, fasting glucose, serum AST and ALT, and decreased the adipocyte size, the number of macrophage and mast cells in adipose tissue, and collagen deposition in liver tissue in the HFD+CCl₄ group compared with the findings of the HFD+CCl₄ group. In contrast, treatment with curcumin on the ND+CCl₄ group did not show a significant difference except the body weight and mast cell number when compared with the ND+CCl₄ group. Furthermore, curcumin significantly reduced the number of parenchymal apoptotic cells, whereas it increased the number of non-parenchymal apoptotic cells, especially resembling an activated hepatic stellate cell in the liver. Taken together, this data suggests that curcumin might be an effective antifibrotic drug for the prevention of liver disease progression in obese mice. Thus, the development of curcumin as a therapy for obesity and liver fibrosis is supported.

Keywords: Curcumin, Obesity, Carbon tetrachloride, Hepatic fibrosis, Apoptosis

Corresponding author: Seung-Joo Jekal
Department of Clinical Laboratory Science,
Wonkwang Health Science University, Iksan
54538, Korea
Tel: 82-63-840-1210
E-mail: sjjei@wu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2015 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: October 30, 2015
Revised: November 4, 2015
Accepted: November 7, 2015

서론

만성적인 과영양으로 인해 발생하는 비만은 조직학적으로 알코올 섭취와 무관하게 간 내에 중성지방이 축적되는 비알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)을 거쳐 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)으로 진

행하며, 좀 더 심해지면 간경변증과 간암종으로 발전한다고 알려져 있다(Farrell과 Larter, 2006). 또한 NAFLD 환자에서 2형 당뇨병이 흔히 발생하며, 이런 환자들에서 비만과 인슐린 저항과 같은 병리유전학적 비정상들을 함께 동반하고 있어서 비만, NAFLD 및 2형 당뇨병은 서로 매우 밀접하게 연관되어 있다(Nakamura와 Terauchi, 2013; Shim과 Kang, 2014).

임상에서 비만과 간질환의 연관성에 관한 NAFLD와 NASH의 병태생리학적 연구는 부분적으로 그 원인이 일차적인 것인지 아니면 이차적이거나 외부환경에 의한 것인지를 구별하기 어려워 제한적으로 이루어질 수밖에 없었다(Ito 등, 2007). 이 때문에 여러 종류의 NAFLD 동물모델들이 개발되고 있는 가운데 최근 패스트푸드(fast food)의 특징인 고포화지방과 고콜레스테롤에 추가로 과당(fructose) 함량을 높인 식이를 개발하여 쥐에 24주 투여한 결과 사람의 NASH에서와 유사하게 비만과 인슐린 저항을 포함하여 조직병리학적 특징인 간세포의 풍선화(ballooning)를 동반한 염증, 섬유증(fibrosis) 및 지방세포자멸사(lipopoptosis)를 보이는 모델을 개발하였다(Chariton 등, 2011). 더불어 이 모델에 간섬유증과 간경변증 유발제로 확립된 소량의 사염화탄소(CCl_4)를 함께 투여하여 8주 만에 지방증, 지방간염 및 섬유증을 유발시키는데 성공하였다(Chheda 등, 2014). 특히 CCl_4 에 의한 간독성은 CCl_4 가 cytochrome P450 효소계를 통하여 산소분자와 신속히 반응하여 CCl_3O_2 를 생성하여 세포막 인지질의 불포화지방산을 공격함으로써 지질 과산화물을 일으켜 발생한다(Weber 등, 2003). CCl_4 에 의한 간 손상은 조직병리학적으로 괴사, 단핵세포 침윤, 지방증(steatosis), 섬유증 및 간경변증을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다(Park 등, 2000). 간섬유증은 만성 간염의 결과로 발생하며 더 진행되면 간경변증으로 발전한다. 간의 만성 조직손상과 염증은 간성상세포(hepatic stellate cells)를 활성화시켜 콜라겐 생성을 유도하여 간에 섬유화를 일으키며 이로 인해 간소염의 기능적 구조가 붕괴되고 문맥혈관 흐름의 저항이 증가되어 고혈압이 발생되며 마침내는 간경변증으로 인해 사망하게 되는 결과를 초래한다(Bruck 등, 2007).

커큐민(curcumin)은 폴리페놀(polyphenol)로서, 생강과에 속하는 강황(turmeric)의 주요 활성물질이며, 카레(curry) 음식 재료로 인도에서 오랫동안 소화기계와 간질환의 염증 치료에 사용되고 있다(Aggarwal과 Sung, 2009). 설치류를 이용한 동물 모델에서 커큐민은 간 질환에 항염증과 항산화 기능이 있는 것으로 보고되어 있다(FU 등, 2008). 특히 커큐민은 CCl_4 로 유도한 간섬유증 모델에서 염증 및 활성 간성상세포의 수를 감소시키고 콜라겐 III형 유전자의 발현을 억제하여 간섬유증을 약화시킨다고 보고하였다(Kang 등, 2002).

본 연구는 C57BL/6 마우스에 고지방식이+ CCl_4 로 간섬유증을 동반한 NASH 모델 유도 후 커큐민을 투여한 후 체중 변화, 혈당 수치, 간기능 검사, 간 콜라겐 침착량과 비만세포 수를 정량화하기 위한 조직병리학적 검사, 염증반응에서의 대식세포 대한 면역조직화학적 검사, 간조직의 세포자멸사 등을 조사하여, 커큐민이 단기간에 유발시킨 간섬유증을 동반한 NASH 동물모델에 미치는 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 10주령의 특정병원균 부재 C57BL/6 수컷 마우스를 KOATECH (Pyungtaek, Korea)으로부터 구입하였다. 명암주기는 12시간 간격으로 사육하면서 일주일간 적응 시킨 후 사용하였다. 실험기간 동안 동물 사육실의 온도는 $21 \pm 2^\circ C$, 상대습도 $55 \pm 5\%$ 를 유지하였으며, 고형사료(Cargill Agri Purina Inc, Korea)와 물을 자유롭게 공급하였다. 실험동물은 원광보건대학교 동물실험윤리위원회 승인을 받은 후 실험동물 관리 및 이용에 관한 지침에 따라 관리하였다.

2. 실험설계

마우스 25마리를 각각 5마리씩 정상식이군(normal diet: ND), 정상식이+ CCl_4 -투여군(NDC), 정상식이+ CCl_4 +curcumin-투여군(NDC+CUR), 고지방식이(high fat diet: HFD)+ CCl_4 -투여군(HFDC), 고지방식이+ CCl_4 +curcumin-투여군(HFDC+CUR)의 5군으로 나누어 실험하였다. 고지방식은 상용화된 지방함량이 60 kcal%의 상품명호 #D12492 (Research Diets inc, USA)를 구입하여 사용하였다. CCl_4 (Junsei, Japan)는 7주 동안 일주일에 2회 각각 500 μL (1:1 olive oil)/체중 100 g와 300 μL (3:7 olive oil)/100 g를 복강 투여하였고, curcumin (Sigma, USA)은 500 mg을 생리식염수 50 mL에 용해하여 매일 1 mL씩 구강 투여하였다. 실험 기간 중 2일 간격으로 먹이 섭취량을 측정하였고, 7일 간격으로 체중과 공복 혈당을 측정하였다. 7주 후 에테르로 마취된 마우스에서 심장 채혈 후, 개복하여 간과 부고환지방을 적출하였다. 무게 측정 후 조직병리학적 검사를 위해 즉시 10% neutral buffered formalin에 고정하였다.

3. 혈당 및 혈청 간기능 검사

혈당 측정을 위해서 측정 12시간 전부터 마우스를 절식시킨 후 꼬리에서 채혈하여 Breeze[®] 2 혈당 측정기(Bayer HealthCare LLC, USA)를 사용하여 측정하였다. 또한 간기능 검사를 위해 심장으로부터 채취한 모든 혈액은 원심분리기(Eppendorf centrifuge, 5415 R, eppendorf, USA)에 옮겨 $4^\circ C$ 의 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 $-70^\circ C$ 냉동고에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 혈청은 자동생화학 분석기(Hitachi Auto Analyser 7170, Japan)를 사용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT) 농도를 측정하였다.

4. 조직병리학적 분석

채취한 간과 부고환 지방조직은 4 μm 두께의 파라핀절편을 제작하여 표준 절차에 따라 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 하였고, 간조직의 콜라겐 침착 양을 보기 위한 sirius red 염색을 하였으며, 부고환 지방조직 내의 비만세포 수를 측정하기 위해 toluidine blue 염색을 하였다.

5. 면역조직화학염색

부고환지방 내의 대식세포 검출을 위해 Ultravision Detection System kit (Thermo Scientific, Fremont, USA)을 사용하여 습윤 챔버에서 F4/80-면역염색을 수행하였다. 그 과정은 4 μm 두께의 파라핀 절편을 제작하여 POLYSINE™ 슬라이드(Thermo Scientific, USA)에 붙이고 58°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈파라핀, 하강 계열알코올에 함수한 다음 면역조직화학염색을 습윤챔버를 사용하여 수기로 시행하였다. 그 과정을 간단히 요약하면 절편을 수세 후 Hydrogen peroxidase block에 10분간 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 차단하였고, Tris buffer saline (Thermo Scientific, Fremont, USA)으로 세척한 다음 Ultra V block을 사용하여 5분간 두어 비특이적 배경염색을 억제시켰다. 이어 일차 항체로 anti-F4/80 antibody[Cl:A3-1] (1:200; Abcam®, Cambridge, UK)를 30분간 반응시킨 다음 Tris buffer saline로 적당히 세척하고 Primary antibody enhancer를 5분간 처리한 후 HRP-polymer를 사용하여 15분간 반응시켰다. 그 후 DAB로 5분간 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 DPX로 봉입하였다.

6. TUNEL 검사

간조직 내의 세포자멸사(apoptosis)를 조사하기 위해 ApopTag Peroxidase In Situ Detection kit (Millipore Co., Billerica, MA, USA)를 사용하여 제조사 매뉴얼을 따라 시행하였다. 그 과정을 간단히 설명하면 파라핀절편을 탈파라핀하여 함수한 후 H₂O₂-methanol을 사용하여 내인성 과산화효소 활성을 차단하였고 proteinase K (Dako, Carpinteria, USA)를 실온에서 15분간 전 처리한 다음 equilibration buffer로 10초간 처리하였고 이어 terminal deoxynucleotidyl transferase를 떨어뜨려 1시간 반응시켰다. 이 절편은 antidigoxigenin conjugate에 반응시킨 후 diaminobenzidine으로 발색한 다음 Gill's hematoxylin으로 대조염색하여 DPX로 봉입하였다. 자멸세포 수 산정은 광학현미경 400배에서 간 실질세포와 비실질세포로 나누어 측정하였다.

7. 영상 분석

부고환 지방조직 내의 F4/80- 면역염색 양성 대식세포 침윤 면적과 간조직 내 sirius red-염색-양성 콜라겐 침착 면적은 광학현미경(Olympus BX 50, Olympus Optical Lts., Japan)에 부착한 디지털 카메라(Olympus DP72, Japan)로 촬영한 디지털 이미지를 영상분석 프로그램(Image-Pro® Plus ver 4.5, Media Cybernetics Inc., Georgia, USA)을 사용하여 측정하여 백분율을 산출하였다. 부고환 지방조직 내의 toluidine blue-양성 비만세포와 간조직 내의 TUNEL-양성 자멸세포의 수 측정은 각각 광학현미경 100 배와 400배에서 5 시야를 측정하여 총 세포 수를 구하였다.

8. 통계분석

각 군간의 비교를 위해 One-Way ANOVA test를 시행하였으며, 유의한 차이가 있을 경우 Turkey multiple range test를 하여 사후 검정하였다. 통계분석은 SPSS ver 10.0을 사용하였으며, 통계적 유의수준 p 값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 체중, 장기 무게, 혈당에 미치는 커큐민의 영향

체중은 2주까지 ND군과 나머지 4군 사이에는 차이가 없었으나 3주에서 ND군에 비해 NDC와 NDC+CUR 두 군 모두 뚜렷하게 감소하기 시작하여 7주까지 감소하는 경향을 보였지만 NDC+CUR 군은 NDC군에 비해서는 다소 증가하는 경향을 보였다. 이에 대해 HFDC군과 HFDC군은 4주부터 ND군에 비해 뚜렷하게 증가하기 시작하여 7주까지 뚜렷한 증가 경향을 보였다. 그러나 HFDC+CUR군은 HFDC군에 비해 4주부터 체중 증가 폭이 적은 것으로 나

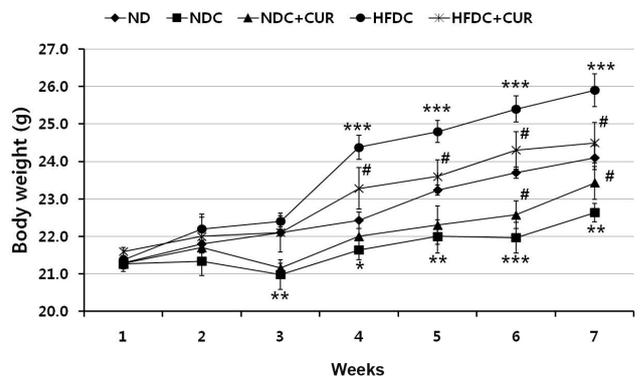


Fig. 1. Effect of curcumin on body weight of mice fed the ND (10 kcal%) or HFD (60 kcal%) with CCl₄-induced hepatic fibrosis for 7 weeks. Values are mean±SEM of five mice. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with ND group; #p<0.01 compared with NDC and HFDC groups.

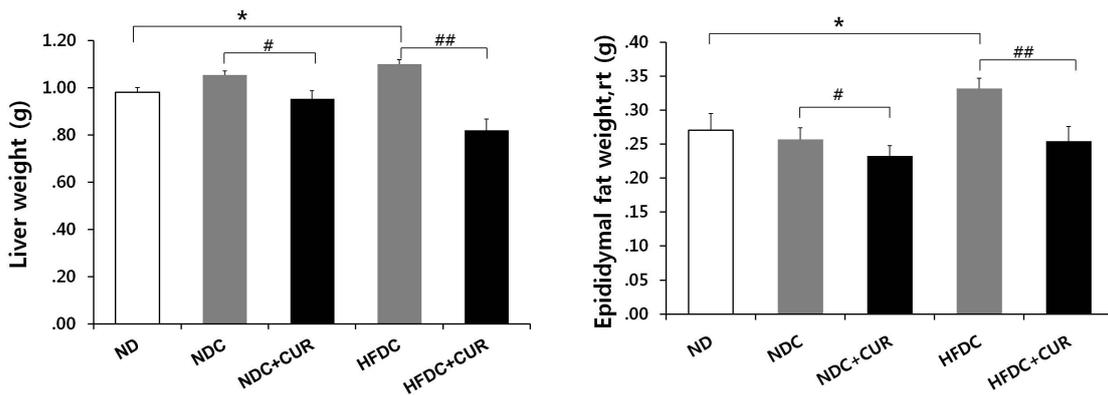


Fig. 2. Effect of curcumin on liver and adipose tissue weight of mice fed the ND (10 kcal%) and HFD (60 kcal%) with CCl₄-induced hepatic fibrosis for 7 weeks. All values were expressed mean±SEM of five mice. **p*<0.05 compared with ND group #*p*<0.05, ##*p*<0.01 compared with NDC and HFDC group.

타났다(Fig. 1).

7주 후 적출한 부고환지방 무게는 ND군에 비해 NDC 군에서는 약간 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었고 HFDC 군에서는 유의하게 증가하였으며, NDC+CUR군과 HFDC+CUR 군에서 NDC군과 HFDC군에 비해 유의하게 감소하였다(*p*<0.05, *p*<0.01). 간 무게는 ND에 비해 NDC군에서 다소 증가하였으나 통계학적 유의성이 없었고 HFDC군에서는 ND군에 비해 유의하게 증가하였으며(*p*<0.05), NDC+CUR군과 HFDC+CUR 군에서는 NDC군과 HFDC군에 비해 유의하게 감소하였다(*p*<0.05, *p*<0.05) (Fig. 2).

혈당 수치는 1주부터 7주까지 ND군에 비해 NDC군과 NDC+CUR 군에서 차이가 없었으나 HFDC군에서는 2주부터 7주까지 ND군에 비해 매우 유의하게 증가하였으며, HFDC군에 비해 HFDC+CUR 군에서는 3주부터 7주까지 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3).

2. 부고환 지방세포 크기와 대식세포 및 비만세포 침윤에 미치는 커큐민의 영향

부고환 지방세포의 크기는 ND군에 비해 NDC와 NDC+CUR군에서는 유의한 차이가 없었으나 HFDC군에서는 매우 유의하게 증가하였고 HFDC+CUR군에서 HFDC에 비해 유의하게 감소하였다 (*p*<0.01, *p*<0.05). 또한 지방세포 사이에 침윤된 대식세포의 수도 ND군에 비해 NDC와 NDC+CUR군에서는 차이가 없었으나 HFDC군에서는 매우 뚜렷하게 증가하였고(*p*<0.001) crown-like structure (CLS)도 많이 관찰되었으며, HFDC+CUR군에서는 뚜렷한 감소 경향을 보였다(*p*<0.01). 비만세포 수는 ND군에 비해 NDC군에서 증가하였고, NDC군에 비해 HFDC군에서 매우 유의하게 증가하였다가(*p*<0.01, *p*<0.01), NDC+CUR과 HFDC+CUR

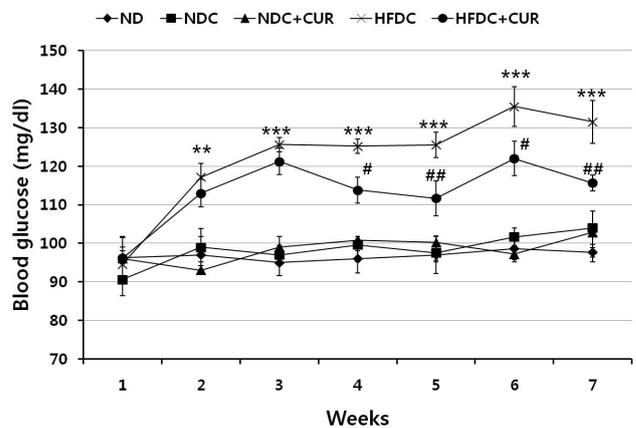


Fig. 3. Effect of curcumin on fasting blood glucose of mice fed the ND (10 kcal%) and HFD (60 kcal%) with CCl₄-induced hepatic fibrosis for 7 weeks. Values are mean±SEM of five mice. ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared with ND group; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 compared with HFDC group.

군에서는 NDC와 HFDC군에 비해 뚜렷하게 감소하였다 (*p*<0.01, *p*<0.01) (Fig. 4).

3. 간기능 수치, 콜라겐 침착 및 자멸세포 수에 미치는 커큐민의 영향

혈청 간기능 지표인 AST, ALT 수치는 ND군에 비해 NDC군과 HFDC군에서 유의하게 증가하였으나(*p*<0.001, *p*<0.01), NDC+CUR군과 HFDC+CUR군에서는 NDC와 HFDC군에 비해 모두 매우 유의하게 감소하였다(*p*<0.001, *p*<0.001) (Table 1). 간 콜라겐의 침착량도 ND군에 비해 NDC과 HFDC군에서 매우 유의하게 증가하였으며(*p*<0.001, *p*<0.001), NDC군과 NDC+CUR 군 사이에는 통계학적인 차이가 없는데 반해, HFDC+CUR군에서는 HFDC군에 비해 매우 유의하게 감소하였다(*p*<0.001). 자멸세

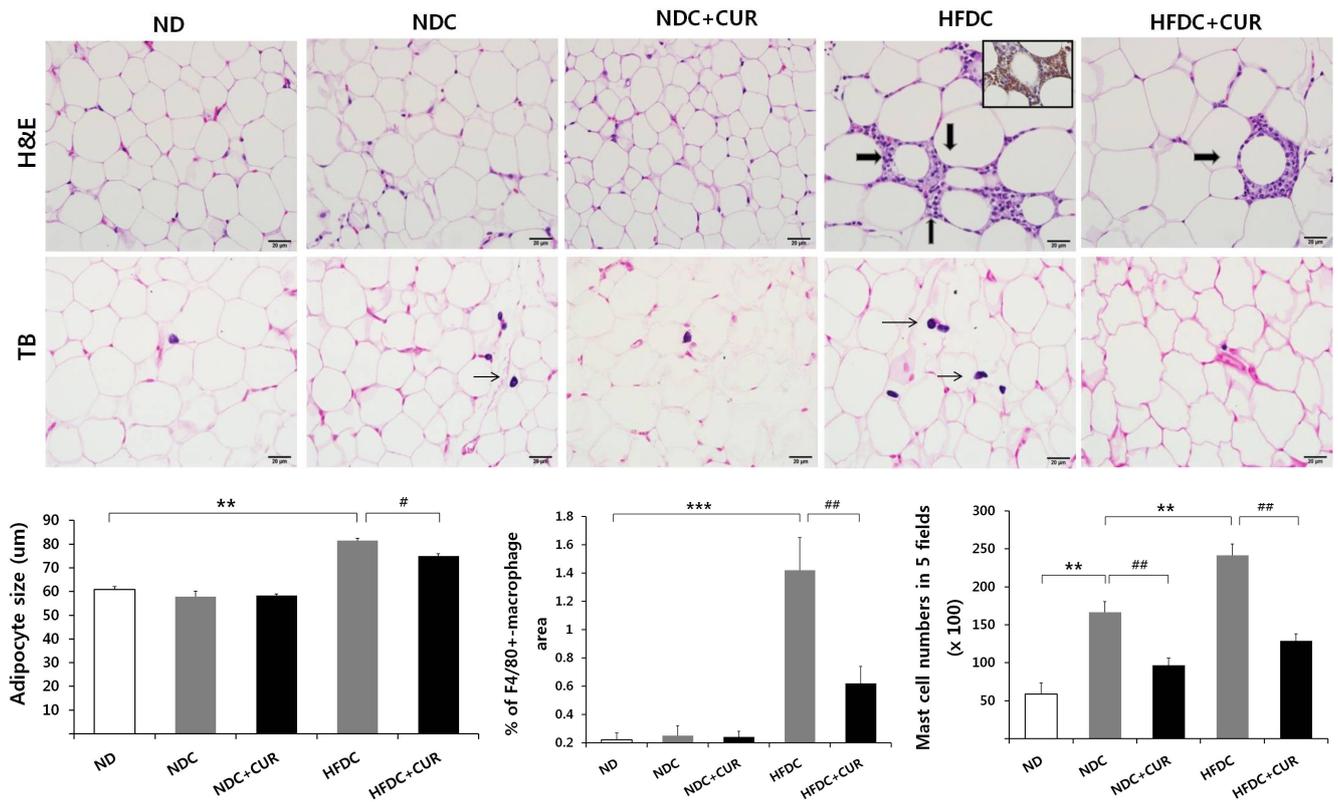


Fig. 4. Effect of curcumin on adipocyte size, F4/80-positive cell area, number of mast cell in the epididymal adipose tissues from mice fed the ND (10 kcal%) and HFD (60 kcal%) with CCl₄-induced hepatic fibrosis for 7 weeks. Thick arrows in H&E-stained pictures indicate adipocytes surrounded by macrophages. Macrophages show F4/80-positive by immunostaining using anti-F4/80 antibody (inset). Toluidine blue (TB) was used to detect mast cells in epididymal adipose tissue. Quantitative image analysis of epididymal adipocyte diameter using a computerized image analysis system. Values are the mean±SEM of five mice. ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared with ND group; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 compared with HFDC group.

Table 1. Effect of curcumin on serum AST and ALT (mean±SEM)

	ND	NDC	NDC+CUR	HFDC	HFDC+CUR
AST(U/L)	86.33±17.09	150.66±26.43 [†]	126.66±28.50 [†]	253.75±32.39 [†]	124±11.53 [§]
ALT(U/L)	31.33±5.77	45.33±9.24*	32.66±4.52 [†]	57±6.48 [†]	32±7.81 [†]

Values are the mean±SEM of five mice. **p*<0.01, [†]*p*<0.001 compared with ND group; [†]*p*<0.01, [§]*p*<0.001 compared with NDC and HFDC groups

포의 수는 간실질세포의 경우 ND군에 비해 NDC군과 HFDC군에서 매우 유의하게 증가하였다(*p*<0.001) NDC+CUR군과 HFDC+CUR군에서 NDC와 HFDC군에서 모두 감소한(*p*<0.01, *p*<0.01) 반면, 비실질세포는 NDC군과 HFDC군에 비해 NDC+CUR군과 HFDC+CUR군에서 매우 유의하게 증가하였는데(*p*<0.01, *p*<0.01), 특히 활성 간성상세포(activated hepatic stellate cell: HSC)의 모양을 한 세포들에서 자멸세포 수가 많음을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

임상적 관점에서 동물 모델 연구는 필수적이며 중요하다. 본 연구에서는 고지방 식이와 CCl₄ 투여에 의해 단기간에 간염유증을 동반한 NASH 마우스 모델을 얻을 수 있었다. 이전 동물 모델들의 연구 보고는 8주간의 기간을 통해 FFD+CCl₄ 랫드에서 간 손상, 섬유증을 유발하였지만 혈당 수치 변화와 같은 대사증후군의 특징까지 유도하지는 못했다(Chedda 등, 2004). 본 연구에서는 60 kcal%의 고지방이 포함된 식이와 CCl₄를 동시에 마우스에 투여하여 사람 NASH에 볼 수 있는 혈당 수치 변화와 함께 조직학적 특징인 지방간

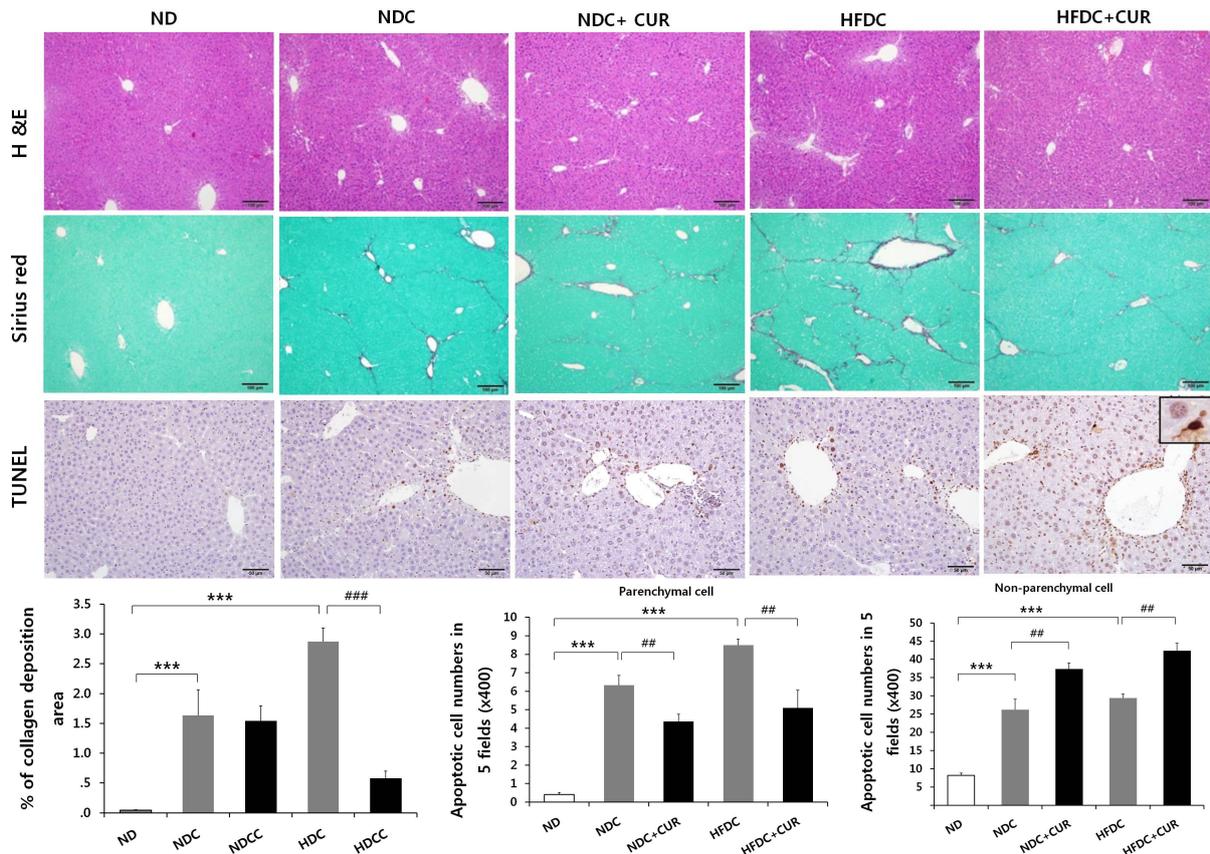


Fig. 5. Effect of curcumin on the collagen deposition and the number of apoptotic cells in the liver tissues from mice fed the ND (10 kcal%) and HFD (60 kcal%) with CCl₄-induced hepatic fibrosis for 7 weeks. Tissue sections were stained with sirius red and TUNEL method using ApoptTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit. Apoptotic cells are stained brown (inset). In NDC+CUR and HFDC+CUR groups, Most of non-parenchymal apoptotic cells resemble closely to activated hepatic stellate cells (inset). The collagen deposition area was quantify by using a computerized image analysis system on the liver sections stained with sirius red, and apoptotic cell numbers were counted under a microscope at a magnification of 400 and were expressed as the total number in five fields. Values are the mean±SEM of five mice. ****p*<0.001 compared with ND group; ##*p*<0.01 compared with NDC and HFDC groups.

염과 함께 진행성 섬유화가 일관되게 유지되는 마우스 모델을 만들어 실험에 사용하였다.

커큐민은 최근 사람과 동물 모델에서 류마티스성 관절염, 염증성 장질환에서 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며(Aggarwal과 Harikumar, 2009; Lubbad 등, 2009), 간섬유증을 비롯한 여러 간 질환의 치료에서도 사용이 보고되어 있다(Bruck 등, 2007; Fu 등, 2008). 본 연구에서는 7주간의 짧은 기간에 고지방식+CCl₄ 투여에 의해 간섬유증을 유발시킨 C57BL/6 마우스를 사용하여 구강을 통해 커큐민을 주입하여 간섬유증에 미치는 보호 효과를 보기 위해 혈청학적, 조직병리학적 분석을 시행하였다.

본 실험에서 단기간의 고지방식+CCl₄ 투여군에서 볼 수 있는 체중 증가는 체내 지방, 특히 부고환 지방의 증가와 밀접하게 관련이 있으며, 혈당 수치의 증가와도 관련되어 있음을 확인하였다. 또한 정상 식이군에 비해 고지방 식이군에서 부고환 지방세포의 크기가 증가하였고, 지방세포들 사이에 대식세포 및 비만세포의 침윤이

뚜렷하게 증가하였다. 뿐만 아니라 정상식이+CCl₄ 투여군에 비해 고지방식이+CCl₄ 투여군에서 간 손상 혈청 지표인 AST, ALT 수치가 증가할수록 간 손상 정도가 심해지면서 간의 콜라겐 침착량이 비례적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

간의 콜라겐 침착량은 섬유화 정도를 반영하는 민감한 지표로 섬유성 간의 총 단백질 함량의 약 50%를 차지하는 것으로 추정한다(Wang 등, 2013). 간섬유증은 간 손상으로 인해 디세강(the space of Disse) 내의 간성상세포가 활성화되어 I형과 III형 콜라겐이 포함된 세포외기질(ECM)을 과다하게 생성함으로써 발생한다(Hernandez-Gea와 Friedman, 2011). 본 실험에서 정상 식이와 고지방 식이에 CCl₄ 만을 투여한 군에 비해 커큐민을 함께 투여한 군에서 콜라겐 생성이 억제되었다. 이 결과는 커큐민이 급성과 만성 CCl₄ 투여에서 간의 지질 과산화물 형성을 감소시키며, 자유라디칼의 청소 기능 이외에 내인성 항산화능을 강화시켜 간에서 다수의 항산화 효소를 유도하고 활성화할 수 있음을 의미한다(Park 등,

2000; Kamalakkannan 등, 2005). 따라서 CCl_4 의 지질 과산화 과정에서 생성된 ROS (reactive oxygen species)나 지질 과산화물은 간성상세포를 활성화시켜 간에 콜라겐 침착을 증가시키는데 (Sharma 등, 2001; Lim, 2014), 커큐민은 간의 항산화능을 높여 간성상세포의 활성을 억제시킴으로써 섬유형성 기능을 약화시키는 것으로 생각된다(Bruck 등, 2007). 또한 TUNEL법에 의한 자멸세포 염색 결과, 커큐민 투여군에서 간실질세포인 간세포의 자멸이 억제된 반면, 대부분 활성화한 간성상세포 모양을 한 비실질세포는 자멸을 증가시키는 것으로 나타났다. 이 결과는 커큐민이 활성화된 간성상세포만 자멸을 유도하지만 간의 실질세포인 간세포의 자멸은 억제하는 기능이 있는 것으로 생각할 수 있다(Priya와 Sudhakaran, 2008). 뿐만 아니라 본 실험에서 커큐민의 구강 투여가 체중 감소와 더불어 부고환 지방 축적을 억제시키며, 부고환 지방조직 내 대식세포와 비만세포를 감소시키는 항염증 및 비만과 관련된 항염증 효과도 확인할 수 있었다(Weisberg 등, 2008). 비만은 흔히 염증성 신호 경로를 활성화시켜 전신적 또는 국소적으로 염증성 사이토카인을 변화시킨다(Shoelson 등, 2006). 이로 인해 비만 상태의 지방조직 내에는 대식세포, 비만세포 등 자연 면역세포들이 많이 침윤된다(Altintas 등 2011). 따라서 커큐민의 항염증 효과는 고지방 식이에 의해 활성화된 염증성 신호 경로를 억제하여 간세포에서는 지방형성 유전자 발현을 약화시키고, 지방조직에서는 염증성 반응을 차단하여 간의 지방증과 체중 증가를 감소시킴으로써 혈당 수치를 낮추고 인슐린 감수성을 유지하는데 기여할 것으로 추정한다(Shao 등, 2012). 이는 인슐린 저항성을 보이는 동물모델에서 아디포넥틴 치료 후에 인슐린 감수성이 증가되었다는 결과와도 일치한다(Yamauchi 등, 2001). 이와 더불어 정상식이+ CCl_4 와 고지방식이+ CCl_4 마우스에서는 커큐민 투여가 간 손상 및 지방간염의 혈청 지표인 AST, ALT 수치를 감소시키는 효과도 나타내었다. 간에서 AST와 ALT는 간 사이토졸 효소로서 이들 수치의 증가는 일반적으로 간세포 손상을 의미하므로 커큐민 투여 시 간 산화 스트레스와 관련된 혈청 과산화물을 저하시켜 간을 보호하는 것으로 생각된다(Park 등, 2000)

위의 결과들을 종합적으로 분석해 볼 때 첫째, C57BL/6 마우스에 고지방 식이와 CCl_4 이중 처치를 통해 단기간에 간염유증을 동반한 NASH 동물 모델을 만들 수 있었다. 둘째, 정상 식이군에 비해 고지방 식이군에 CCl_4 를 투여하였을 경우 비만과 관련된 혈당 수치를 높이고, 지방세포 내 지방 축적, 염증 및 섬유화를 훨씬 더 심하게 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다. 셋째, 고지방 식이로 유도한 비만 마우스에서 커큐민의 구강 투여가 지방조직의 항염증 작용과 더불어 간염유증 억제에 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 넷째, 특히 커큐민 투여군에서의 간조직 내의 섬유화 감소는 커큐민이 활

성 간성상세포(activated HSC)의 자멸을 유도하여 콜라겐 생성을 억제시킨 결과로 생각된다.

요약

커큐민(curcumin)은 강황 내 주요 폴리페놀 화합물의 한 성분으로 비만과 관련된 비알코올성 지방간염을 막아 주는 것으로 잘 알려져 있다. 이 연구의 목적은 고지방 식이로 키운 비만 마우스에서 사염화탄소(CCl_4)로 유발한 간염유증에 미치는 커큐민의 보호 효과를 조사하기 위해 시도하였다. 군간 비교를 위해, 정상 식이와 고지방 식이로 키운 마우스에 7주간 CCl_4 를 투여하면서 동시에 커큐민을 투여한 것과 투여하지 않은 군으로 나누었으며, 체중이나 혈당과 같은 대사 프로파일이나 지방세포의 크기 및 간염유증의 변화를 조사하기 위해 혈청 생화학적 검사, 조직학적 검사 및 면역조직화학적 검사를 수행하였다. 또한 간세포 내자멸세포의 관찰을 위해 TUNEL 법을 사용하였다. 그 결과 고지방식이+ CCl_4 마우스에 커큐민을 투여한 군에서는 투여하지 않은 군에 비해 체중, 공복혈당 수치, 혈청 AST, ALT 수치가 낮았고, 지방조직 내의 지방세포 크기와 대식세포 및 비만세포 수가 감소하였다. 이와 반대로 정상식이+ CCl_4 마우스에 커큐민을 투여한 경우에는 투여하지 않은 군에 비해 체중과 비만세포 수 이외에는 통계학적인 차이가 없었다. 더욱이 커큐민은 간조직의 간실질세포의 자멸세포 수는 줄인 반면 활성화 간성상세포 모양의 비실질세포의 자멸세포 수를 증가시켰다. 이 결과를 종합해 볼 때 커큐민은 비만 마우스의 간질환 진행에서 효과적인 항섬유 치료제로서 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgment: 이 논문은 2014학년도 원광보건대학교 교내 학술 연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

Funding: 2014학년도 원광보건대학교 교내학술연구비

Conflict of interest: None

References

1. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009, 41: 40-59.
2. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2009, 30:85-94.
3. Altintas MM, Azad A, Nayer B, Contreras G, Zaias J, Faul C, et al. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J Lipid Res.* 2011,

- 52:480-488.
- Bruck R, Ashkenazi M, Weiss S, Goldiner I, Shapiro H, Aeed H, et al. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. *Liver Int.* 2007, 27:373-383.
4. Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, et al. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011, 301:825-834.
 5. Chheda TK, Shivakumar P, Sadasivan SK, Chandrasekharan H, Moolamath Y, Oommen AM, et al. Fast food diet with CCl₄ micro-dose induced hepatic fibrosis -a novel animal model. *BMC Gastroenterol.* 2014, 14:89-97.
 6. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006, 43:99-112.
 7. Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol.* 2008, 73:399-409.
 8. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011, 6:425-456.
 9. Ito M, Suzuki J, Tsujioaka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology.* 2007, 37:50-57.
 10. Kang HC, Nan JX, Park PH, Kim JY, Lee SH, Woo SW, et al. Curcumin inhibits collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in-vivo and in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 2002, 54:119-126.
 11. Kamalakkannan N, Rukkumani R, Varma PS, Viswanathan P, Rajasekharan KN, Menon VP. Comparative effects of curcumin and an analogue of curcumin in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005, 97:15-21.
 12. Lim Y. The protective effects of green tea catechin on the bleomycin and cyclophosphamide induced cytotoxicity. *Korean J Clin Lab Sci.* 2014, 46:75-78.
 13. Lubbad A, Oriowo MA, Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem.* 2009, 322:127-135.
 14. Nakamura AI, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci.* 2013, 14:21240-21257.
 15. Park EJ, Jeon CH, Ko G, Kim J, Sohn DH. Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *J Pharm Pharmacol.* 2000, 52:437-440.
 16. Priya S, Sudhakaran PR. Cell survival, activation and apoptosis of hepatic stellate cells: modulation by extracellular matrix proteins. *Hepatology.* 2008, 38:1221-1232.
 17. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006, 116:1793-1801.
 18. Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, et al. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One.* 2012, 7(1):e28784.
 19. Sharma RA, Ireson CR, Verschoyle RD, Hill KA, Williams ML, Leuratti C, et al. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels. *Clin Cancer Res.* 2001, 7:1452-1458.
 20. Shim MJ, Kang YJ. Relationships between metabolic syndrome component and depression, stress. *Korean J Clin Sci.* 2014, 46:68-74.
 21. Wang Y, Cheng M, Zhang B, Nie F, Jiang H. Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats. *PLoS One.* 2013, 8(3):e58659.
 22. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003, 33:105-136.
 23. Weisberg SP, Leibel R, Tortoriello DV. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. *Endocrinology.* 2008, 149:3549-3558.
 24. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001, 7:941-946.