

흰쥐에서 SAL5의 알코올성 지방간 형성에 미치는 영향

김복규^{1#}, 양원경¹, 박양춘², 정가영³, 신은주³, 도선길³, 김승형^{1*}

1 : 대전대학교 동서생명과학연구원, 2 : 대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 3 : (주) 유니베라

Effect of SAL5 on chronic ethanol-induced fatty liver model

Bok-Kyu Kim^{1#}, Won-Kyung Yang¹, Yang-Chun Park², Ga-Young Jung³
Eun-Ju Shin³, Seon-Gil Do³, Seung-Hyung Kim^{1*}

1 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, Daejeon 34520, Republic of Korea

2 : Division of Respiratory Systems, Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

3 : Univera, Inc., Seoul 04782, Korea

ABSTRACT

Objective : In this study, we investigated the effect of SAL5(mixing extracts of *Schisandra chinensis* Baillon, *Artemisia capillaris* Thunb., and *Aloe vera* Linne) on chronic ethanol-induced fatty liver model.

Methods : Sprague-Dawley male rats were fed Liber-DeCarli (normal), ethanol liquid diet (control), SAL5 (200 mg/kg). We administrated the SAL5 on chronic ethanol-induced fatty liver model for 5 weeks. We measured alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and γ -glutamyl transpeptase (γ -GTP) in serum and triglyceride (TG), superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) level in liver. Liver histopathology was examined by Hematoxylin-eosin and Oil red O staining of the fixed liver tissues. Real-time PCR was performed to measure the mRNA expression of inflammatory cytokines and MMP-2, MMP-9.

Results : SAL5 administration resulted in significantly decreased liver marker enzymes activities of alanine transaminase (ALT), γ -glutamyl transpeptase (γ -GTP) in serum and triglyceride (TG) activities in liver. The control group decreased the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) with the reduced level of glutathione (GSH) in liver. On the other hand, SAL5 group increased the activities of SOD, CAT and the level of GSH. SAL5 delayed the development of an alcoholic fatty liver by reversing fat accumulation in the liver, as evidenced in histological observations. The gene expression of mRNA were significantly decreased at the IL-1 β , TNF- α , NOS-II and MMP-2 by SAL5.

Conclusions : These results indicate that SAL5 might have protective effect chronic ethanol-induced fatty liver models.

Key words : SAL5, chronic ethanol-induced fatty liver, ethanol liquid diet

I. 서 론

현대사회에서 만성적인 음주로 인한 알코올 환자의 증가는 서구 선진국뿐 아니라 전 세계적으로 커다란 사회문제로 대두되고 있다¹⁾. 우리나라도 음주로 인한 환자 치료 및 교육비 부

담이 증가하는 추세이며²⁾, 음주 관련 질병을 억제하거나 도움이 되는 생리활성물질 연구가 어느 때보다 주목받고 있다. 알코올성 지방간 (alcoholic fatty liver)은 과음으로 인해 중성지방이 간 조직에 축적되는 질환이다³⁾. 과량의 알코올을 만성적으로 섭취하면 세포내 NADH/NAD⁺의 비율이 증가하여 탄수화물,

*Corresponding author : Seung-Hyung Kim, Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-280-2642 · Fax : +82-42-274-2600 · E-mail : sksh518@dju.kr

#First author : Bok-Kyu Kim, Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-280-2642 · Fax : +82-42-274-2600 · E-mail : qhrrb79@dju.kr

· Received : 5 December 2017 · Revised : 20 December 2017 · Accepted : 15 January 2018

단백질 및 지질대사의 장애가 일어나, 간의 지방산 산화가 감소되고, 합성은 증가되어 간에 중성지질이 축적되며, 알코올 분해과정의 중간생성물인 아세트알데히드의 독성에 의해 microtubule의 손상이 일어나 지방간이 유발되고 심해지면 알코올성 간염이나 간경화증이 유발될 수 있다⁴⁾. 또한, 알코올 대사작용이 촉진되어 산소 소비량이 증가함에 따라 간조직의 부분적인 저산소증과 괴사를 초래하거나 알코올 대사 시 생성되는 유리라디칼에 의해 지질과산화물의 반응이 촉진되어 간 조직을 손상시킬 수 있으며⁵⁾, 간 조직의 중성지질 및 콜레스테롤 함량이 크게 증가하고, 활성산소가 증가하여 간세포 파괴를 유발할 수 있다⁶⁾. 또한, 알코올 대사에 의해 유도되는 CYP 2E1, p450 reductase, NADPH oxidase, aldehyde oxidase, xanthine oxidase 등은 생체 내 반응산소종의 생성을 낳고 과량의 알코올 대사에서 이러한 효소들은 다량의 자유유리기를 생성함으로써 생체 내 산화스트레스를 유발하며 알코올성 간 손상의 원인이 된다⁷⁾. 만성적인 알코올 섭취는 글루타치온 등과 같이 자유유리기를 중화시키는 항산화제의 생성이나 작용을 저해함으로써 산화스트레스를 촉진하여 간세포 손상을 일으킨다⁸⁾.

오미자 (*Schisandra chinensis* Baillon)는 오미자과 (Schisandraceae)에 속하는 오미자나무의 열매로 간 보호작용이 있으며 정상상태의 쥐에게 투여했을 때 간기능 촉진작용이 있어 혈청 중의 중성지방을 저하시키고 간 지방질을 감소시키며 약물대사 효소활성을 촉진 시키며⁹⁾¹⁰⁾, 항산화효과가 있다고 알려져 있다¹¹⁾¹²⁾. 사철쭉 (*Artemisia capillaris* Thunb.)은 국화과 (Compositae)에 속하는 다년생 초본으로¹³⁾ 사철쭉에 대한 연구로는 항산화 활성¹⁴⁾ 및 소염진통 효과¹⁵⁾, 염증반응 조절 및 superoxide 생성 억제¹⁶⁾ 등이 보고되어 있다.

알로에는 백합과 (Liliaceae)의 알로에속에 속하는 다년생 초본 열대 식물로 민간요법으로 동서양에서 널리 사용되어 왔다. 400여종의 알로에 중 알로에 베라 (*Aloe vera* Linne)는 가장 널리 알려져 있으며, 상업 또는 치료목적으로 가장 많이 활용되고 있다¹⁷⁾.

알로에 겔은 면역 증진 또는 조절에 의한 상처 치료 효과, 살균작용 및 항염증, 항암, 면역조절 및 소화계 보호 효과 등이 보고되고 있다¹⁸⁻²²⁾.

SAL5는 오미자, 사철쭉, 알로에 베라 세 가지 식물 추출물로 구성되어 있으며, 페놀 화합물을 함유하는 몇 가지 식물이 활성산소의 청소부 역할과 항산화 활동과 관련이 있는 것으로 알려져 있어, 페놀 화합물을 함유하는 38종의 식물추출물 중에 스크리닝 과정을 거쳐 선발된 3가지 식물추출물을 혼합하여 항산화 작용과 활성 산소 억제 효능을 확인하였고²³⁾, 알코올에 의해 유도된 지방간 모델에서도 효능이 있는지 확인해 보고자 하였다. 지방간 모델을 제작하기 위해 사용한 Lieber-DeCarli 액체 식이는 다른 만성 알코올 식이 모델과는 달리, 임상적으로 사람의 알코올성 간 질환의 초기 단계와 유사한 경미한 간 손상을 일으킨다^{24,25)}. 따라서 이번 연구에서는 SAL5의 알코올성 지방간에서의 효과를 평가하기 위하여 Lieber-DeCarli 액체 식이를 이용한 알코올성 지방간 모델을 제작하여 실험을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험물질

SAL5는 *S. chinensis* 추출물, *A. capillaris* 추출물과 *Aloe vera*를 함유한 복합체이다. *S. chinensis* 추출물과 *A. capillaris* 추출물은 70 % 에탄올 추출물로 제조하였으며, *Aloe vera*는 (주)유니베라 (서울)로부터 제공 받았다. SAL5는 *S. chinensis* 추출물, *A. capillaris* 추출물, *Aloe vera*를 4 : 8 : 3 비율로 섞은 고유의 혼합물이다.

2. 실험동물 사육 및 Lieber-DeCarli 액체식이 공급 방법

실험동물은 6주령 수컷 Sprague-Dawley rat (Harlan Sprague Dawley, Inc., (주)중앙실험동물, Seoul, Korea)를 실험 기간 동안 평균 온도 23 ± 2 °C, 습도 50 ± 2 %로 유지하였으며, 밤낮 주기 (12시간 light/12시간 dark, light turn on 9 am)가 조절되는 환경에서 물과 기본사료를 자유롭게 섭취하면서 2 주간 적응 시켰다. 동물사육에 사용된 식이는 미국 영양학회 (American Institute of Nutrition, AIN)가 추천하는 Lieber-DeCarli 식이 (Bethlehem, PA, USA)를 사용하였다. Lieber-DeCarli 액체식이 (중앙실험동물, Seoul, Korea)는 가루 형태로 구입하여 매일 아침 사료 공급 전 가루 상태에 증류수를 첨가하여 액상 상태로 만들어 사료 1 ml당 1 kcal가 되도록 제조하여 사용하였다. 실험동물은 난괴법에 의해 8마리씩 6군으로 나누어, 기본사료를 공급받는 SD-Normal 군, Lieber-DeCarli 액체 표준식이를 공급받는 LDC-정상군 (LDC-Normal), LDC-정상군 표준식이의 탄수화물 대신에 에탄올에 의한 열량 보충으로 LDC-정상군과 동일한 열량의 액체식이를 공급받는 대조군 (CT), 대조군과 동일한 액체식이를 공급받는 시험군 SAL5 (200 mg/kg)로 하였다. 약물희석은 0.5 % CMC (Carboxymethyl Cellulose, Sigma Aldrich, USA)로 혼탁하여 제작하고, 대조군은 0.5 % CMC 용액을 동량 투여하였다. 약물투여는 경구 투여용 금속제 존대 (zonde)를 이용하여 위 내로 강제 경구 투여하였다. (승인번호 DJUARB 2014-042)

3. 혈청 생화학적 분석

실험 종료 후 실험동물을 ethyl ether으로 마취시킨 후 50 I.U heparin (APU8AF, 중외제약) 20 μ l을 처리한 3 ml 주사기 (BD Emerald TM, USA)를 이용하여 심장천자법으로 채혈하였다. 실험동물로부터 분리한 혈청에서 alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)를 생화학자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

4. 간 triglyceride 함량 분석

실험 종료 후 실험동물의 간을 적출하여 무게를 측정하고 -70 °C에 보관하였다. 간에서의 중성지방 (triglyceride) 함량은 95 % EtoH 500 μ l에 0.1 g 또는 0.2 g의 간을 넣은 뒤 그라인더로 갈고 원심분리 후 상층액 200 μ l 사용하여 sodium chlorate (NaClO₃)와 Triton X-100을 1 : 1 : 1 비율로 섞은 뒤 이 용액으로 TG 측정을 하였다.

5. 간 조직학적 분석 (hepatic histology)

지방간 증상 정도를 확인하기 위하여 간을 절취하여 10 % neutral buffered formalin에 24 시간 동안 고정 시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4 μ m 두께의 조직절편을 제작하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 및 Oil red O 염색을 시행한 뒤 xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학 현미경을 이용하여 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

6. Glutathione (GSH)과 Malondialdehyde (MDA) 함량 측정

간 조직 중 reduced glutathione (GSH)는 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)(DTNB)와 NADPH가 반응하는 원리를 이용한 방법으로 측정하였다²⁶⁾. 지질과산화물인 malondialdehyde (MDA)의 함량은 지질과산화물이 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 원리를 이용하여 측정한 흡광도 값을 MDA 검량 표준 곡선에 의거하여 계산하였다²⁷⁾.

7. 항산화효소 활성 측정

간 조직 중 catalase (CAT)활성은 20 mM 과산화수소를 기질로 균질액 내의 CAT에 의해 감소되는 과산화수소량을 측정하는 방법²⁸⁾으로 측정하였고, superoxide dismutase (SOD)활성은 xanthin과 xanthine oxidase의 반응에서 형성된 superoxide anion radical이 tetrazolium blue와 formazan을 형성하는 원리를 이용한 방법²⁹⁾으로 측정하였다.

8. 간 조직에서 유전자 발현 분석

실험 종료 후 각 실험동물로부터 적출한 간 조직에서의 유전자 발현 양상을 real-time PCR 증폭법을 사용하여 관찰하였다. 간 조직 (0.05 g)을 RNazolB (Tel-Test)용액으로 Total RNA를 추출한 뒤 cDNA 합성 및 real-time PCR 분석을 하였다. 간 조직 (liver tissue)에 RNazolB 500 μ l를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하여 여기에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시

13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. 역전사 (reverse transcription)반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10 U/ μ l) 2 U/tube를 37 °C heating block에서 30분간 반응한 후 75 °C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37 °C heating block에서 45분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 °C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다(Table 1).

Table 1. Rat Probe & Oligonucleotide primers for real time PCR amplification.

Gene	type	Primer sequence
rat IL-1 β	forward	5'-CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGG -3'
	reverse	5'-TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT -3'
rat IL-6	forward	5'-TTCCTACCCCAACTTCCAATG -3'
	reverse	5'-ATGAGTTGGATGGTCTTGGTC -3'
rat TNF- α	forward	5'-GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT -3'
	reverse	5'-TGCTACGACGTGGGCTACG -3'
rat NOS-II	forward	5'-CTTTACGCCACTAACAGTGGCA -3'
	reverse	5'-AGTCATGCTCCCATCGCTC -3'
rat COX-2	forward	5'-TGGTGCCGGTCTGATGATG -3'
	reverse	5'-GCAATGCGGTTCTGATACTG -3'
rat MMP-2	forward	5'-CAGGGAATGAGTACTGGGTCTATT -3'
	reverse	5'-ACTCCAGTTAAAGGCAGCATCTAC -3'
rat MMP-9	forward	5'-AATCTCTTCTAGAGACTGGGAAGGAG -3'
	reverse	5'-AGCTGATTGACTAAAGTAGCTGGA -3'
GAPDH	forward	5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC -3'
	reverse	5'-TGACAAAGTGGTCGTTGAGG -3'

유전자 발현은 TaqMan probe (FAM dye-labeled, ABI, USA)를, internal standard를 Mouse GAPDH probe set; Endogenous Control (VIC® / MGB Probe, Probe limited) from Applied Biosystems (4352338E)을 사용하였고, primer 의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은: pre-denaturation은 2 min at 50 °C, 10 min 94 °C, 그리고 40 cycles을 0.15 min at 95 °C, 1 min at 45 °C에서 수행하였다. 실험군과 대조군은 internal

standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative PCR $y = x(1+e)^{-n}$ $x =$ starting quantity $y =$ yield $n =$ number of cycles $e =$ efficiency 로 계산하여 RQ (relative quantitative)을 측정하였다.

9. 통계처리

실험 결과는 평균 (mean)과 표준편차 (SD)로 나타내었고, 일원배치 분산분석 (one way ANOVA)을 실시한 후, student's t-test를 실시하였으며, $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$ 수준일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 혈청 중 AST, ALT, ALP, γ -GTP 활성 변화

혈청 내 AST (Fig. 1A)활성은 모든 실험군에서 큰 차이가 나타나지 않았고, ALT (Fig. 1B)와 γ -GTP (Fig. 1D)활성은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 증가하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. ALP (Fig. 1C)활성은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 증가하였지만 유의성은 없었고, SAL5 200 mg/kg 투여군에서도 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 없었다.

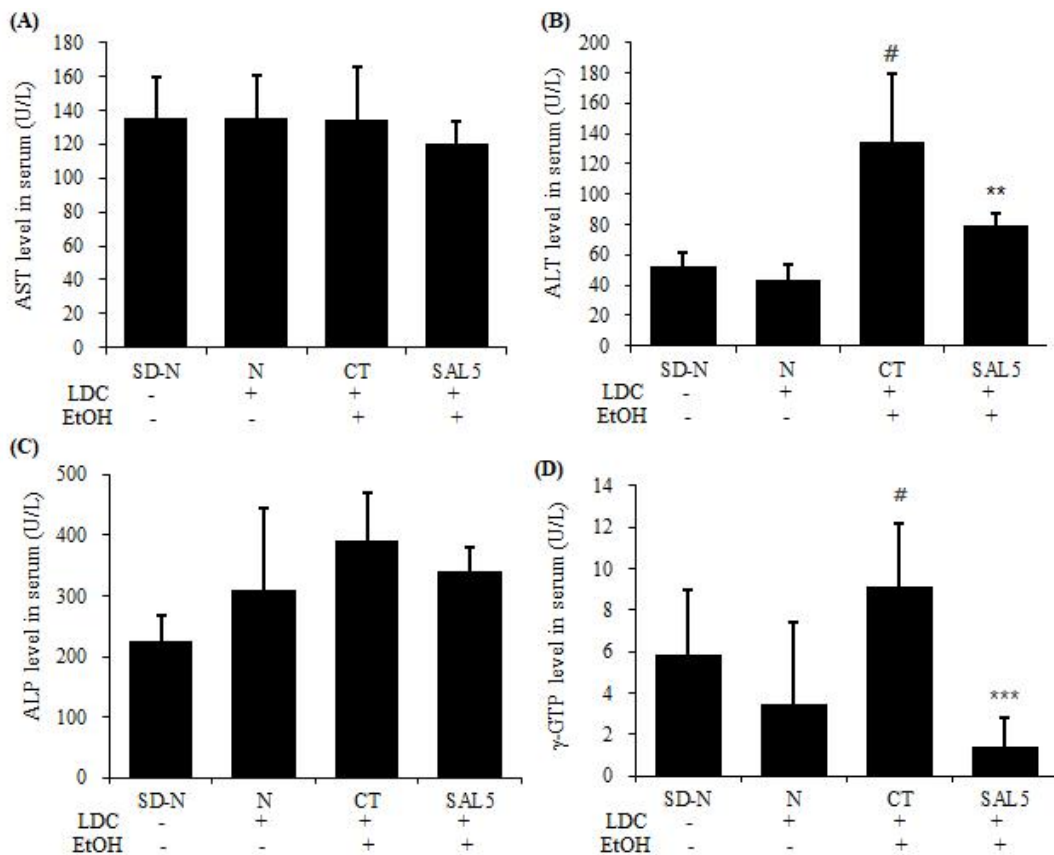


Fig. 1. Effects of SAL5 on the AST, ALT, ALP and γ -GTP activity in serum of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. Blood samples were collected using cardiac puncture method. SD-N: diet, N: LDC diet, CT: ethanol diet, SAL5: ethanol diet with 200 mg/kg. The results were expressed the mean \pm SD (N = 8). Statistically significant value compared with control group data by student's t-test. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) # : $p < 0.05$ compared with LDC-normal group.

2. 간 중성지방 함량 변화

간에서 triglyceride (TG)함량은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 증가 하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

3. 간 조직학적 분석

지방간 증상 확인을 위해서 조직학적 분석을 한 결과, LDC-정상군에 비하여 대조군에서는 간세포의 지방구의 크기가 넓고 크게 분포하고 있는 것을 확인 하였고, SAL5 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 간세포의 지방구의 크기가 비교적 작고 고르게 퍼져 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

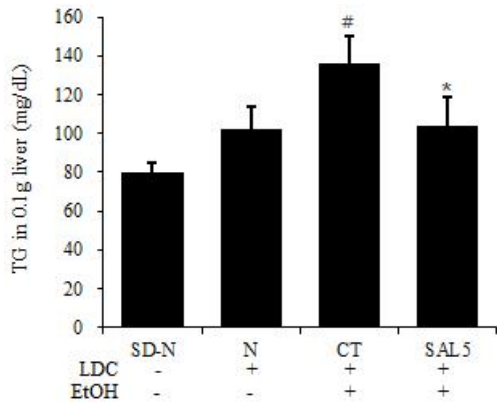


Fig. 2. Effects of SAL5 on the triglyceride (TG) in liver of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. After the animals were sacrificed, the liver was removed and TG concentration were measured. SD-N: diet, N: LDC diet, CT: ethanol diet, SAL5: ethanol diet with 200 mg/kg. The results were expressed the mean \pm SD (N = 8). Statistically significant value compared with control group data by student's t-test. (*p < 0.05) # : p < 0.05 compared with LDC-normal group.

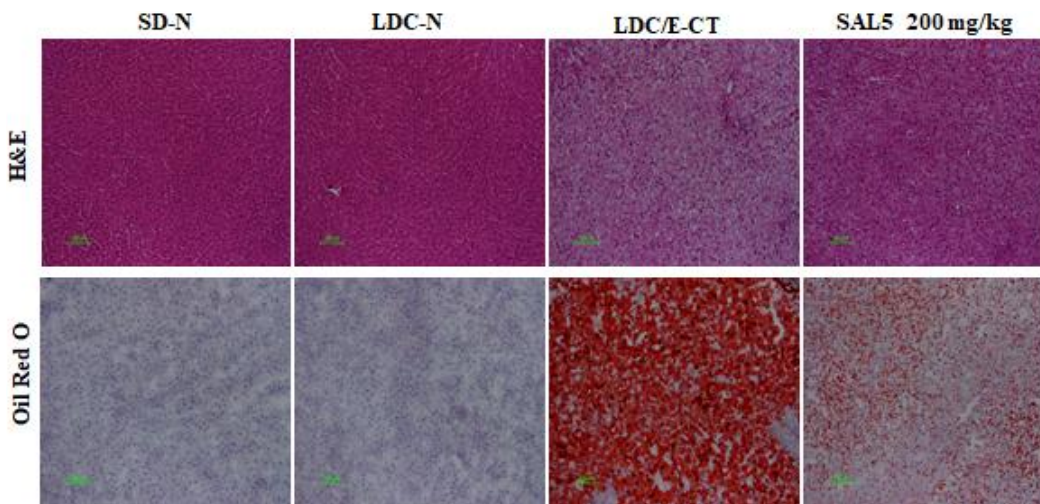


Fig. 3. Effect of SAL5 on fat accumulation in liver tissue of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. At the end experiment, the livers were fixed, and histologic analysis was performed. These images were captured under a light microscope at $\times 100$ magnification.

4. 간 조직 항산화효소 활성

SOD 활성 (Fig. 4A)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 감소하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, Catalase 활성 (Fig. 4B)은 SAL5 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

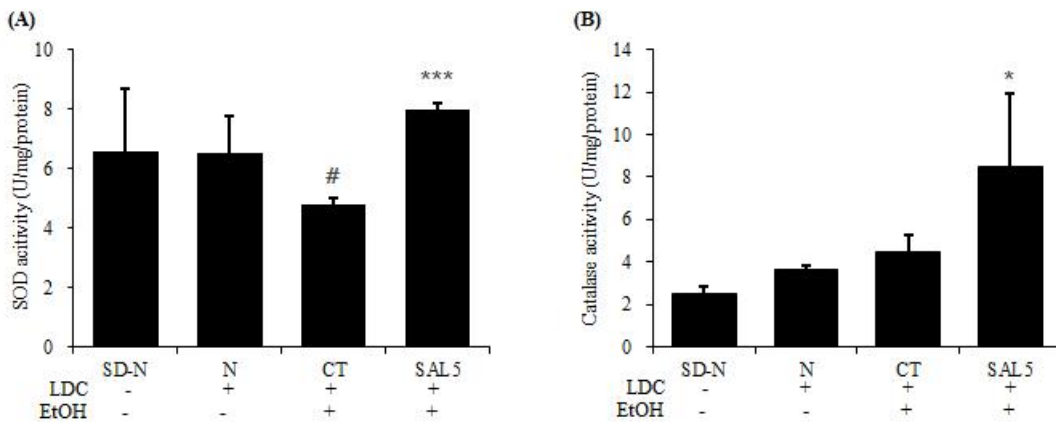


Fig. 4. Effects of SAL5 on the SOD and catalase activity in liver tissue of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. After the animals were sacrificed, the liver was removed and SOD, catalase activity were measured. SD-N: diet, N: LDC diet, CT: ethanol diet, SAL5: ethanol diet with 200 mg/kg. The results were expressed the mean \pm SD (N = 8). Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test. (*p < 0.05, ***p < 0.001) # : p < 0.05 compared with LDC-normal group.

5. 간 조직 MDA, GSH 함량

간 조직내에서 MDA 함량 (Fig. 5A)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 증가하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다. GSH 함량 (Fig. 5B)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 감소하였으나 유의성은 없었고, SAL5 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다.

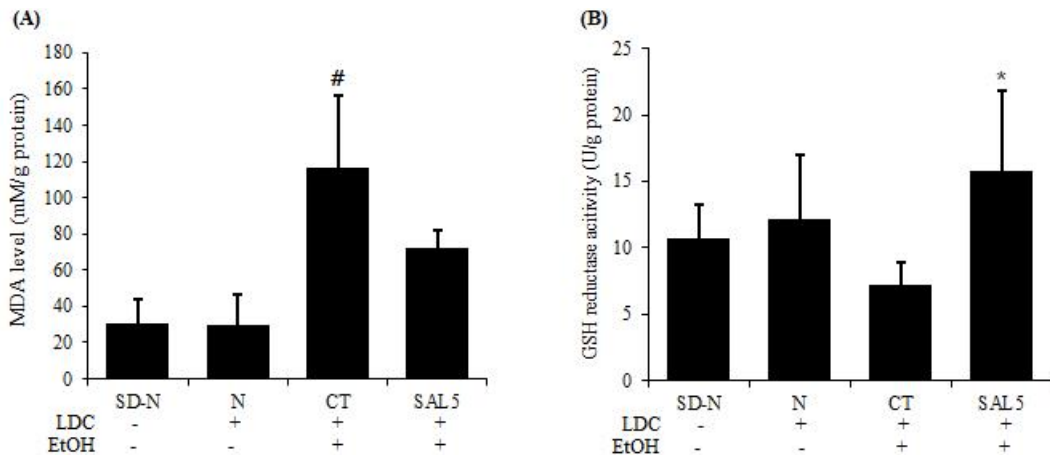


Fig. 5. Effects of SAL5 on the MDA and GSH concentration in liver tissue of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. After the animals were sacrificed, the liver was removed and MDA, GSH concentration were measured. SD-N: diet, N: LDC diet, CT: ethanol diet, SAL5: ethanol diet with 200 mg/kg. The results were expressed the mean \pm SD (N = 8). Statistically significant value compared with control group data by student's t-test. (*p < 0.05) # : p < 0.05 compared with LDC-normal group.

6. 간 조직 염증사이토카인 유전자 발현 분석

간 조직에서 유전자 발현은 대조군의 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 SAL5 200 mg/kg 투여군의 상대정량 값을 분석하였다. IL-1 β , TNF- α mRNA 유전자 발현 (Fig. 6A, B)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 증가하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. IL-6 mRNA 유전자 발현 (Fig. 6C)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 증가하였지만 유의성은 없었고, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 없었다.

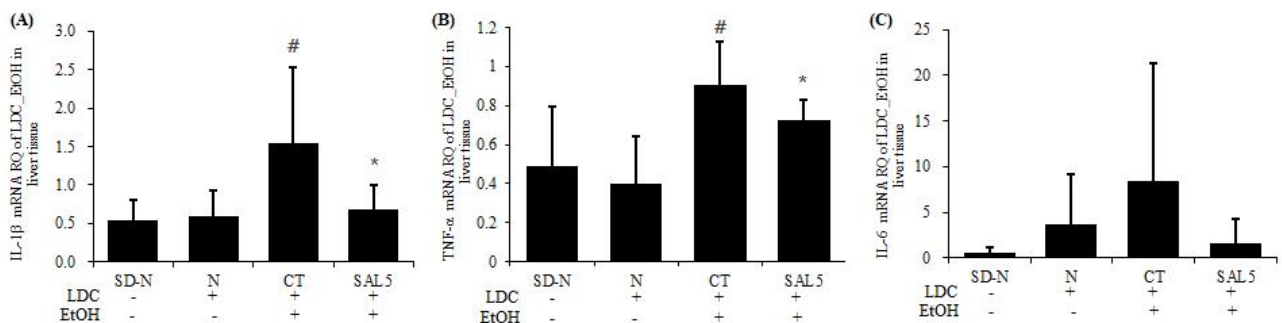


Fig. 6. Effects of SAL5 on pro-inflammatory cytokines mRNA expression in liver tissue of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. After the animals were sacrificed, the liver was removed and IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA gene expression analysed quantitative real-time PCR at the end of the experiment, SD-N: diet, N: LDC diet, CT: ethanol diet, SAL5: ethanol diet with 200 mg/kg. The results were expressed the mean \pm SD (N = 8). Statistically significant value compared with control group data by student's t-test. (*p < 0.05) # : p < 0.05 compared with LDC-normal group.

7. 간 조직 NOS-II, COX-2 mRNA 유전자 발현 분석

간 조직에서 유전자 발현은 대조군의 NOS-II, COX-2 mRNA 유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 SAL5 200 mg/kg 투여군의 상대정량 값을 분석하였다. NOS-II mRNA 유전자 발현 (Fig. 7A)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있게 증가하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 NOS-II mRNA 유전자 발현이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 그리고, COX-2

mRNA 유전자 발현 (Fig. 7B)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 증가하였지만 유의성은 없었고, SAL5 200 mg/kg 투여군에서 COX-2 mRNA 유전자발현이 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 없었다.

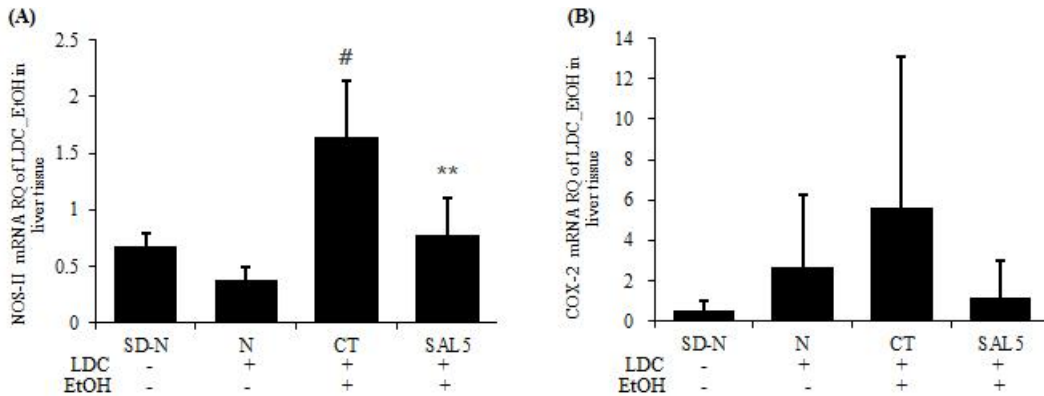


Fig. 7. Effects of SAL5 on NOS-II, COX-2 mRNA expression in liver tissue of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. After the animals were sacrificed, the liver was removed and NOS-II, COX-2 mRNA gene expression analysed quantitative real-time PCR at the end of the experiment. SD-N: diet, N: LDC diet, CT: ethanol diet, SAL5: ethanol diet with 200 mg/kg. The results were expressed the mean \pm SD (N = 8). Statistically significant value compared with control group data by student's t-test. (**p < 0.01) #: p < 0.05 compared with LDC-normal group.

8. 간 조직 MMP-2, MMP-9 mRNA 유전자 발현 분석

간 조직에서 유전자 발현은 대조군의 MMP-2, MMP-9 mRNA 유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 SAL5 200 mg/kg 투여군의 상대정량 값을 분석하였다. MMP-2, MMP-9 mRNA 유전자 발현 (Fig. 8A, B)은 LDC-정상군에 비하여 대조군에서 증가하였지만 유의성은 없었고, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 MMP-2 mRNA 유전자발현 (Fig. 8A)이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.

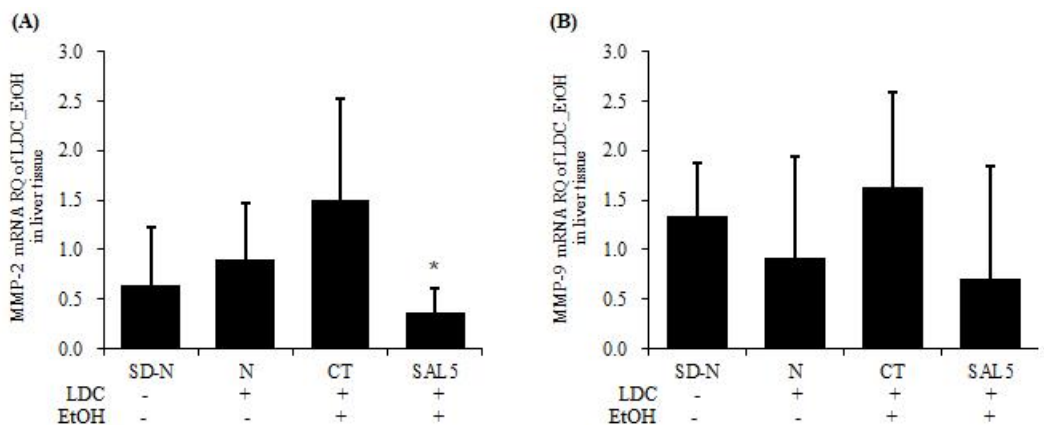


Fig. 8. Effects of SAL5 on MMP-2, MMP-9 mRNA expression in liver tissue of chronic ethanol-induced fatty liver model. The rats were orally administered with SAL5 for 5 weeks. After the animals were sacrificed, the liver was removed and MMP-2, MMP-9 mRNA gene expression analysed quantitative real-time PCR at the end of the experiment. SD-N: diet, N: LDC diet, CT: ethanol diet, SAL5: ethanol diet with 200 mg/kg. The results were expressed the mean \pm SD (N = 8). Statistically significant value compared with control group data by Student's t-test. (*p < 0.05)

IV. 고 찰

본 연구는 만성적인 알코올 섭취 시 나타나는 알코올성 지방간에서 SAL5 복합물이 알코올성 지방간의 형성 및 간 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행되었다. 알코올성 지방간 동물 모델은 Lieber-DeCarli 액체 표준식이 섭취를 통하여 유도하였다. Lieber-DeCarli 액체 표준식이 사용할 경우 알코올

섭취량을 늘릴 수 있고, 이로 인해 지속적으로 혈중 알코올 농도를 높게 유지시킬 수 있다³⁰⁾. 간은 유입되는 혈액의 지방산을 이용하여 중성지방을 합성하고 필요시에는 중성지방을 혈액으로 방출하기도 하는데, 장기간의 알코올 섭취에 의한 간조직의 손상은 중성지방의 간의 유출을 억제하여 혈액순환계의 중성지방 및 기타 지방의 농도를 낮추고 동시에 간의 조직 축적으로 유도하는 것으로 알려졌다³¹⁾. 혈청의 AST와 ALT의

활성은 고지방 식이, 고콜레스테롤 식이, 알코올 등으로 인한 간세포 독성 시 간세포에 장애가 발행하고, 간세포의 과사가 진행되어 혈액으로 AST와 ALT가 유리됨에 따라 혈장 내에서 활성이 증가한다고 알려져 있다³²⁾. 간세포의 모세관담즙 응모, 담관상피 등에 주로 존재하고 골격 내 석회화를 촉진시키고, 장내 인 흡수 등에 관여하는 효소인 ALP는 골질환이나 간질환 등에서 활성이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다³³⁾. 또한, 혈중 γ -GTP는 지방간 유발시 활성이 증가하는데 특히, 알코올에 민감하게 반응하고 간이나 담도에 질환이 있으면 다른 효소보다 높은 이상치를 보이는 것으로 보고되고 있다³⁴⁾.

본 연구에서 SAL5 200 mg/kg 투여로 ALT, γ -GTP의 혈중 농도는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고, ALP 농도는 대조군에 비해 감소하였지만 유의성은 없었다. 또한 간에서 triglyceride 활성을 유의적으로 감소시켰으므로 SAL5는 알코올에 의한 독성으로부터 간을 보호하고 간세포 손상을 예방할 수 있다고 사료된다. 지방간은 과다한 알코올 섭취로 인한 간 독성 유발의 초기증상으로 간세포에 산소나 영양적인 측면에서 불균형을 초래하는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 간세포 내의 지방 입자는 지방간이 유발됨으로써 수와 부피가 증가하게 된다³⁶⁾. 지방간 증상을 판단하기 위해 H&E, Oil red O 염색을 실시하여 조직학적 분석을 하였다. LDC-정상군에 비하여 대조군에서 간세포의 지방조직이 넓고 크게 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었고, 대조군에 비하여 SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 간세포에 축적된 지방구가 비교적 작고 고르게 퍼져 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 SAL5 투여로 인해 알코올을 섭취한 동물의 간지질 함량을 개선하여 간 조직 지방질 축적에 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 만성적인 또는 과량의 알코올 섭취는 NADH/NAD⁺의 비율을 증가시켜 탄수화물, 지방 및 단백질 대사 장애를 초래하는데 특히 간에서 지방산의 산화가 억제되는 동시에 지방산 합성이 증가되어 지방간을 초래한다^{37,38)}. 또한 간세포의 마이크로솜 알코올 산화효소 (MEOS)를 유도하고 이 과정에서 유도되는 cytochrome P4502E1 (CYP2E1)은 reactive oxygen species (ROS)를 정상적인 조건에서보다 4~8배 정도 많이 생성한다. 이때 생성된 ROS가 생체막의 불포화지방산에 작용, 과산화지질을 생성하여 세포의 산화적 손상을 초래하고 여러 질환의 발생 및 노화를 촉진하게 된다³⁹⁻⁴²⁾. 인체에는 과잉 생성된 ROS를 제거하여 세포막과 세포내 물질을 보호하기 위한 항산화 기전이 존재하는데 그 중 한 가지 방법은 항산화 비타민이나 flavonoids와 같은 항산화제에 의해 제거되는 것이고 다른 한 가지 방법은 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH-px) 등과 같은 항산화 효소에 의해 제거되는 것으로 이러한 기전이 산화적인 손상으로부터 신체를 방어하는 역할을 한다^{43,44)}.

본 연구에서 SAL5 200 mg/kg 투여로 SOD와 Catalase 활성이 대조군에 비해 유의성 있게 증가된 것으로 보아 항산화 효소들을 효과적으로 활성화시켜 알코올성 산화스트레스로부터 간 보호 효과를 갖는 것으로 사료된다. 지질과산화는 활성산

소종들에 의해 매개된 기작으로서 여러 동물 인체실험들을 통하여 다양한 종류의 간 손상을 일으키는 것으로 알려져 왔다⁴⁵⁾. Malondialdehyde (MDA)는 지질과산화 과정 중 생성되는 대표적 활성 알데히드로, 조직 내 알코올에 의해 유도된 지질과산화물의 함량은 MDA 양으로 측정될 수 있다⁴⁶⁾. 본 연구에서 MDA 함량은 LDC-정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 증가하였고, SAL5 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비해 감소하였지만 유의성은 없었다. 하지만 MDA 함량이 감소된 것으로 보아 알코올에 의해 유도된 지질과산화 과정을 억제하는데 효과가 있다고 사료된다. GSH는 생명체에 존재하는 주요 비단백 thiol로서 인체의 산화적 손상에 대한 방어체제에서 중요한 역할을 담당한다. 과산화물을 환원시키는 다양한 효소 과정에서 각종 효소들과 함께 세포 내외적으로 주요한 역할을 하는 비효소계 항산화제인 GSH는 redox 반응 및 해독작용을 통하여 정상 세포들의 구조 및 기능을 유지시켜준다⁴⁷⁾. GSH 함량은 LDC-정상군에 비해 대조군에서 감소하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 증가된 것으로 보아 알코올 섭취로 인해 GSH 함량이 감소되는 것을 보호했을 것이라고 사료된다. 간세포의 염증과 관련된 cytokine 유전자인 TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-8 등의 발현정도와 간 손상 정도와는 상당한 연관성이 있다고 알려져 있으며⁴⁸⁻⁵⁰⁾, 모두 간 조직의 감염이 시작 또는 진행되는 과정에서 그 발현이 증가한다. 염증 cytokine 유전자 발현 분석은 염증 인자인 NOS-II, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6을 통하여 mRNA 유전자발현 분석을 하였으며, SAL5 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 IL-1 β , TNF- α , NOS-II mRNA 유전자발현은 유의성 있게 감소되었으며, IL-6와 COX-2 mRNA 유전자 발현도 감소되는 것을 확인하였다. 또한 간성상세포와 쿠퍼세포에서 생성되는⁵¹⁾ 간 섬유화 관련 유전자인 MMP-2, MMP-9 mRNA 유전자 발현은 SAL5 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 연구결과를 바탕으로 SAL5는 알코올에 의한 간 손상을 보호하는데 기여할 수 있을 것이라고 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 만성적 에탄올의 섭취에 의해 유도된 지방간 쥐 모델에서 SAL5의 알코올성 지방간 형성에 미치는 영향에 대해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈중 ALT, γ -GTP 그리고, 간 triglyceride 함량은 SAL5 200 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 감소하였다.
2. SAL5 200 mg/kg 투여군에서 알코올 섭취로 인해 증가 되는 지방축적을 억제 하였다.
3. SOD, catalase 활성은 SAL5 200 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 증가 하였다.

4. SAL5 200 mg/kg 투여군에서 MDA 함량은 감소되었으며, GSH 함량은 유의성 있게 증가 하였다.
5. IL-1beta, TNF- α , NOS-II mRNA 유전자 발현은 SAL5 200 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 감소되었고, IL-6, COX-2 mRNA 유전자 발현은 감소되었지만 유의성은 없었다.
6. SAL5 200 mg/kg 투여군에서 MMP-2 mRNA 유전자 발현은 유의성 있게 감소되었고, MMP-9 mRNA 유전자 발현은 감소되었지만 유의성은 없었다.

결론적으로 간 기능 지표수준을 개선시키고, 지질과산화물 수준을 감소시키며, 항산화 효소 활성 증가와 GSH 함량 감소 억제, 간 조직에서 지방축적 감소효과 등을 통해 SAL5는 알코올에 의해 형성된 지방간을 개선하는데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 (주)유니베라의 지원으로 수행된 연구결과입니다.

References

1. Lee YH. Effect of *Ligularia stenocephala* extract on lipid metabolism and liver function of rat administered with ethanol. MS Thesis, Dong-A University, Busan, Korea, 2001.
2. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009 ; 373 : 2223-33.
3. Neuman MG, French SW, Casey CA, Kharbanda KK, Nanau RM, Rasineni K, McVicker BL, Kong V, Donohue TM Jr. Changes in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease - preclinical studies. *Exp Mol Pathol*. 2013 ; 95(3) : 376-84.
4. Lieber CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcoholism Clin Exp Res*. 1991 ; 15(4) : 573-92.
5. Rouach H, Clement M, Ofanelli MT, Janvier B, Nordmann J, Nordmann R. Hepatic lipid peroxidation and mitochondria susceptibility to peroxidative attacks during ethanol inhalation and withdrawal. *Biochem Biophys Acta*. 1983 ; 753(3) : 439-44.
6. Moncade C, Torres V, Varghese G, Albano E, Israsel Y. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms. *Mol Pharmacol*. 1994 ; 46(4) : 786-91.
7. Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology*. 1992 ; 16(4) : 992-6.
8. Garcí-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Rodés J, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J Clin Invest*. 1994 ; 94(1) : 193-201
9. Hikino H, Kiso Y, Taguchi H, Ikeya Y. Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* fruits. *Planta Med*. 1984 ; 50(3) : 213-8.
10. Maeda S, Takeda S, Miyamoto Y, Aburada M, Harada M. Effects of gomisins A on liver functions in hepatotoxic chemicals-treated rats. *Jpn J Pharmacol*. 1985 ; 38(4) : 347-53.
11. Toda S, Tanizawa H, Arichi S, Takino Y. Inhibitory effects of methanol extracts of crude drugs on the air oxidation of linoleic acid. *Yakugaku, Zasshi*. 1984 ; 104(4) : 394-7.
12. Ikeya Y, Taguchi H, Mitsuhashi H, Sasaki H, Matsuzaki T, Aburada J, Hosoya E. Studies on the metabolism of gomisins A (TJN-101). I. oxidative products of gomisins A formed by rat liver S9 mix. *Chem Pharm Bull*. 1988 ; 36(6) : 2061-9.
13. Kim TJ. Korea resources plants IV. Seoul National University Press, Seoul, Korea, 1996.
14. Jung MJ, Yin Y, Heo SI, Wang MH. Antioxidant and anticancer of extract from *artemisia capillaris*. *Kor J Pharmacogn*. 2008 ; 39(3) : 194-8.
15. Kim SN, Kim HS, Nam GS, Hwang SW, Hwang SY. The anti-inflammatory and analgesic activities of *artemisia capillaris* Thunberg. *Kor J Pharmacogn*. 2005 ; 36(4) : 338-43.
16. Ak JS. Effect of *Artemisia caillaris* on the iNOS expression and superoxide formation in the RAW264.7 cells. *J Trad Kor Med*. 1999 ; 9 : 200-11.
17. Grindlay D, Reynolds T. The Aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J Ethnopharmacology*. 1986 ; 16 : 117-51.
18. Sheo HJ. The physiological efficacy of aloe gel. *J Korean Soc Food Nutr*. 1995 ; 24(6) : 1026-38.
19. Hamman JH. Composition and applications of aloe vera leaf gel. *Molecules*. 2008 ; 13(8) : 1599-616.
20. Choi JH, Kim DW, Yoo JK, Han SS, Shim CS. Effect of aloe on learning and memory impairment animal model samp8. *Korean J Life Sci*. 1996 ; 6(3) : 178-84.
21. Ha BJ. A study on the reduction of heavy metal biotoxicity by aloe. *J Korean Environmental Sci Soc*. 1998 ; 7 : 46-51.
22. Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*. 1999 ; 68 : 3-37.
23. Yimam M, Jiao P, Moore B, Hong M, Cleveland S,

- Chu M, Jia Q, Lee YC, Kim HJ, Nam JB, Kim MR, Hyun EJ, Junq G, Do SG. Hepatoprotective activity of herbal composition SAL, a standardize blend comprised of *Schisandra chinensis*, *Artemisia capillaris*, and *Aloe barbadensis*. *J Nutr Metab*. 2016.
24. Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol*. 1989 ; 24(3) : 197–211.
25. de la M Hall P, Lieber CS, DeCarli LM, French SW, Lindros KO, Jarvelainen H, Bode C, Parlesak A, Bode JC. Models of alcoholic liver disease in rodents: A critical evaluation. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 ; 25 : 254–261.
26. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 1981 ; 77 : 373–82.
27. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990 ; 186 : 421–31.
28. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984 ; 105 : 121–6.
29. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 ; 244(22) : 6049–55.
30. Mathews S, Xu M, Wang H, Bertola A, Gao B. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 ; 306(10) : 819–23.
31. Zeman FJ. Liver disease and alcoholism in clinical nutrition and dietetics. 2nd ed. Macmillan Publ, New York, NY, USA. 1991 : 517–53.
32. Plaa GL, Charbonneau M. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. *Principles and Methods of Toxicology* 5th ed. 1994 : 1465–507.
33. Zieve L, Anderson WR, Dozeman R. Hepatic regenerative enzyme activity after diffuse injury with galactosamine, relationship to histological alterations. *J Lab Clin Med*. 1988 ; 112(5) : 575–82.
34. Friedman SL. Acetaldehyde and alcoholic fibrogenesis: fuel to the fire, but not the spark. *Hepatology*. 1990 ; 12 : 609–12.
35. Seong SI, Park KE, Nagata M, Yoshitake N. Effect of metamorphosis on the major hemolymph proteins of the silkworm. *Arch Insect Biochem Physiol*. 1985 ; 2 : 91–104.
36. Shon MH, Cha JY, Lee CH, Park JH, Cho YS. Protective effect of administrated glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Sci Biochemol*. 2007 ; 16 : 967–74.
37. Mezey E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr*. 1980 ; 33(12) : 2709–18.
38. Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med*. 2000 ; 67(1) : 84–94.
39. Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology*. 1994 ; 106(4) : 1085–105.
40. Purohit V, Brenner DA. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology*. 2006 ; 43(4) : 872–8.
41. Brenner DA, Chojkier M. Acetaldehyde increases collagen gene transcription in cultured in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1987 ; 262(36) : 17690–5.
42. Yoshikawa T, Kondo M (Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, eds). Free radical lipid peroxidation and vitamin E in liver injury. In *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 1989 ; 2 : 167.
43. Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Ann Rev Nutr*. 1992 ; 12 : 139–59.
44. Lawrence RA, Burk F. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976 ; 71(4) : 952–8.
45. Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. In situ detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases. *Hepatology*. 1997 ; 26(1) : 135–42.
46. Veca CE, Wilhelm J, Harms-Rihdsdahl M. Interaction of lipid peroxidation product with DNA. A review. *Mutat Res Rev Genet Toxicology*. 1988 ; 195(2) : 137–49.
47. Ahn TH, Yang YS, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun WJ, Park SC, Kim JC. Ameliorative effects of pycnogenol® on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage in rats. *Phytother Res*. 2007 ; 21(11) : 1015–9.
48. Shin EC, Choi YH, Kim JS, Kim SJ, Park JH. Expression patterns of cytokines and chemokines genes in human hepatoma cells. *Yonsei Med J*. 2002 ; 43(5) : 657–64.
49. Mammaev SN, Lukina EA, Lugovskaia SA, Levina AA, Shul' pekova IuO, Pochtar' ME, Ivashkin VT. Cytokine production in patients with chronic viral hepatitis C during treatment with interferon- α . *Klin Lab Diagn*. 2001 ; 8 : 45–8.
50. Czaja MJ, Flanders KC, Biempica L, Klein C, Zern MA, Weiner FR. Expression of tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β 1 in acute liver injury. *Growth Factors*. 1989 ; 1(3) : 219–26.
51. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human Type IV collagenase gene. *J Biol Chem*. 1990 ; 265(19) : 11077–82.