



Original Article / 원저

알코올 유발 간 손상 마우스 모델에서 자금정의 간 보호 효과

김광연^{1#}, 박광일^{1,2,3#}, 조원경¹, 마진열^{1*}

¹한국한의학연구원 한의기술응용센터, ²경상대학교 수의과학대학,
³경상대학교 생명과학연구원

Liver Protective Effects of Jageum-Jung in Alcohol-induced liver injury mice model

Kwang-Youn Kim^{1#}, Kwang-Il Park^{1,2,3#}, Won-Kyung Cho¹, Jin-Yeul Ma^{1*}

¹Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

²Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

³Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University

ABSTRACT

Objectives : This study investigated the hepatoprotective effects of Jageum-jung extract on alcohol-induced liver disease mice model.

Methods : Alcoholic liver disease was induced by Ethanol in C57/BL6 male mice, which were fed Lieber-DeCarli liquid diet containing ethanol. Jageum-jung (100,200 and 300 mg/kg bw/day) were orally administered daily in the alcoholic fatty liver disease mice for 16 days.

Results : The results indicate that Jageum-jung promotes hepatoprotective effects by significantly reducing aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels as indicators of liver damage in the serum. Furthermore, Jageum-jung decreased accumulation of triglyceride and total cholesterol, increased levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in the serum of the alcoholic fatty liver disease mice model. Additionally, it improved the serum alcohol dehydrogenase (ADH) activity.

Conclusions : This study confirmed the anti-oxidative and hangover elimination effects of Jageum-jung extract, and suggests the possibility of using Jageum-jung to treat alcoholic liver disease.

Key words : herbal formula, Jageum-jung, alcohol, liver damage, antioxidant.

I. 서론

자금정(紫金錠)은 5가지 한약재[오배자(五倍子), 산자고(山茱萸), 대극(大戟), 속수자(續隨子), 사향(麝香)]을 포함하는 한방 처방이며, 중국, 일본, 한국에서 해독 및 암과 염증 치료에 사용되었다¹⁾. 이전 연구에 따르면 자금정은 HepG2 간암 세포에서 세포주기 억제와 활성 산소종 생성 등에 관여하여 세포고사를 유도한다²⁾. 또한 자금정은 아토피피부염 치료 및 궤양성 대장염 완화 효과도 보고된바 있다³⁻⁵⁾. 하지만, 알코올성 간질환에 대한 자금정의 치료 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다. 자금정에 포함된 오배자는 율무과(Anacardiaceae)의 낙엽소교목인 붉나무(*Rhus chinensis* Mill.)에 오배자면충(*Melaphis chinensis*)이 기생하여 발생한 벌레집(insect gall)을 건조한 것으로 항바이러스, 항혈전, 항산화 및 간보호 효과가 보고된바 있다⁶⁻⁸⁾. 또한 대극과 사향의 경우도 항염 효과가 보고되었다^{9,10)}. 이러한 항염, 항산화 및 간보호 작용은 알코올성 간질환 치료에 유효한 효과를 보일 것으로 사료된다.

전 세계적으로 알코올 소비와 관련한 문제가 현저히 증가하고 있다¹¹⁾. 알코올성 간질환은 과음, 폭음 및 잦은 음주 형태의 과도한 알코올 섭취로 인해 지방 간 또는 간 염증에 이르기까지 다양한 간 기능 장애를 유발하며, 결국 간 경변 및 간암으로 진행하여, 간 질환으로 인한 사망의 주요 원인이 된다^{12,13)}. 알코올성 지방간 질환에서 지방 축적의 근본 원인은 주로 지방산의 과도한 합성, 지방산 산화 억제 및 트리글리세리드 침윤을 동반한 간세포의 지방 축적을 의미 한다¹⁴⁾. 또한 알코올은 알코올 대사에 의한 산화 스트레스, 돌연변이 유발 acetaldehyde의 형성 및 pro-inflammatory cytokine 생성을 통해 간 손상을

일으킨다¹⁵⁾. 알코올은 알코올 탈수소 효소에 의해 간에서 acetaldehyde로 대사되고, acetaldehyde는 알데히드 탈수소 효소에 의해 추가로 아세트산으로 산화 된 다음 시트르산주기를 통해 이산화탄소로 바뀐다¹⁶⁾. 이들 경로는 활성 산소종 (ROS) 생성을 초래하고 산화 스트레스를 유발하여, 간 손상에 중요한 역할을 한다. 우리나라의 경우 알코올에 의한 간질환 발생이 증가하고 있으며, 현재 알코올성 간 질환의 치료를 위한 연구가 활발히 진행 중에 있으나, 현재의 치료법은 효과적이지 않다.

따라서, 선행 연구 결과에 근거하여 자금정이 알코올성 간질환 치료에 활용될 수 있는 근거를 마련하기 위하여 알코올로 유발한 간독성 동물모델을 이용하여 항산화 및 숙취 제거 효과를 관찰하여 간보호에 대한 가능성을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

5가지 한약재(문합, 산자고, 대극, 속수자, 사향)로 구성된 자금정은 청신한약방(Daegu, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

2. 실험동물 및 식이

6주령 C57BL/6 male 마우스를 (주) 샘타코(Osan, Korea)로부터 분양받아 온도 22±2°C, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(07:00~19:00)이 자동설정 된 동물 사육실에서 1주간 시판 고형사료로 적응시켰다. 체중 평균 및 편차 고려하여 각 군간 체중이 일정하도록 분리하여 Lieber-DeCarli 액체식이(control diet, Dyets, Inc., Bethlehem, PA)로 적응을 위해 5일간 급여하였다. 5일 후, 액체식이 탄수화물인 maltose

#These authors equally contributed to this work.

*Corresponding author : Jin-Yeul Ma. Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70, Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.

Tel: +82-53-940-3812, Fax: +82-53-940-3899, E-mail: jyuma@kiom.re.kr

•Received : April 24, 2020 / Revised : May 28, 2020 / Accepted : May 28, 2020

dextrin 대신 에탄올로 일부 열량을 대치하는 액체식이물(EtOH diet, Dyets, Inc., Bethlehem, PA)를 정상군 및 자금정 단독 처리군을 제외한 나머지 군에 10일간 급여하였다. 11일째 EtOH (5 g/kg) 또는

maltose dextrin (9 g/kg)을 경구 투여 9시간 후 희생하였으며, 자금정은 동일 시간에 14일간 경구 투여하였다. 실험 전 기간 동안 일정 시간에 체중 및 식이섭취량을 산출하였다(Figure 1)¹⁷⁾.

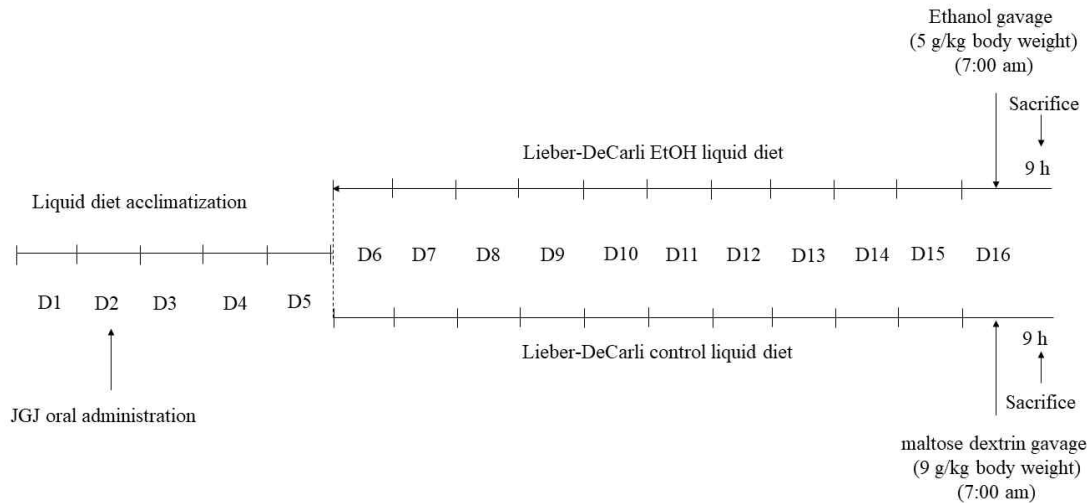


Figure 1. The basic overview of the model procedures [National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) model]

3. 조직학적 분석

간 조직의 일부를 10% para formaldehyde (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정시키고, 파라핀에 매립하고, 단면으로 절단하여 hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

4. 간기능 지표 효소 및 항산화 효소 활성 측정

전혈은 복대정맥에서 채취하였고, 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT)는 혈액생화학자동분석기기 (XL-200; ERBA Mannheim, Germany)를 이용하여 분석하였다. 간 조직에서 Total-cholesterol (TC) 및 triglyceride은 cholesterol 및 triglyceride Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여, VERSAmax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 측정하였다. 또한 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD) 및 Glutathione (GSH) 활성은 각각 SOD 및 GSH Assay kit (Cayman, Michigan, USA)를 이용하였으며, Alcohol Dehydrogenase (ADH) 활성은 Alcohol Dehydrogenase Assay Kit

(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하였다.

5. 통계처리

모든 실험값은 3회 이상 반복 실험한 결과를 기준으로 하였으며 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 ANOVA로 분석을 실시하여 검정하였다. P-value<0.05를 유의 수준으로 간주하였으며, mean±SEM 값으로 표기 하였다.

III. 결과

1. 자금정 투여에 따른 식이량, 체중 및 간 무게 변화

실험동물에 알코올과 자금정을 2주간 급여 한 후 마우스의 식이효율 및 체중증가율을 측정하였다. 식이섭취량은 정상식이만 급여한 마우스에서 10.5±0.7 ml/day으로 정상식이에 자금정을 투여한 마우스(11.3±1.0 ml/day) 간에 유의차가 적었으며, 알코올 식이로 급여 시킨 마우스(7.4±0.4 ml/day)는 유의적으로 감소되었다(Table 2). 알코올 식이에 자금정을 투여한 마우스는 알코올 식이만 급여한 마우스보다 식이섭취량이 유의성 있게 증가하는 것을 확인하

였다(Table 1). 체중증가율은 정상식이만 급여한 마우스에서 24.9 ± 2.1 g으로 정상식이에 자금정을 투여한 마우스(25.1 ± 2.1 g) 간에 유의차가 적었으며, 알코올 식이로 급여 시킨 마우스(19.8 ± 1.6 g)는 유의

적으로 감소되었다(Table 2). 알코올 식이에 자금정을 투여한 마우스는 알코올 식이만 급여한 마우스와 비교했을 경우, 체중증가율은 유의차가 없었다(Table 2).

Table 1. Dietary Intake in Mice Fed either the Control or Ethanol-Containing Lieber-DeCarli Diet

Group	Dietary intake (mL)		
	5 days	10 days	15 days
Control diet	11.1 ± 1.1	10.8 ± 0.5	10.5 ± 0.7
control diet + JGJ (200 mg/kg b.w)	11.4 ± 0.9	11.0 ± 0.3	11.3 ± 1.0
EtOH diet	11.7 ± 1.1	7.0 ± 0.4	$7.4 \pm 0.4^{###}$
EtOH diet + JGJ (50 mg/kg b.w)	10.0 ± 0.9	7.0 ± 0.5	7.8 ± 0.4
EtOH diet + JGJ (100 mg/kg b.w)	10.7 ± 1.4	7.2 ± 0.6	$7.9 \pm 0.1^{**}$
EtOH diet + JGJ (200 mg/kg b.w)	10.2 ± 1.8	7.1 ± 0.7	$7.8 \pm 0.3^*$

Data are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM, n=10). Statistical analyses were different values according to the one-way ANOVA with Tukey's range test (Control diet vs EtOH diet $###p < 0.001$, EtOH diet vs EtOH diet+JGJ $***p < 0.001$).

Table 2. Body Weight of Control and Experimental Mouse Groups

Group	Body weight (g)			
	Initial	5 days	10 days	15 days
Control diet	20.7 ± 1.3	21.5 ± 1.5	23.1 ± 1.7	24.9 ± 2.1
Control diet + JGJ (200 mg/kg b.w)	20.8 ± 0.7	21.3 ± 0.9	22.7 ± 1.6	25.1 ± 2.1
EtOH diet	21.5 ± 1.7	21.9 ± 1.6	20.2 ± 1.8	$19.8 \pm 1.6^{###}$
EtOH diet + JGJ (50 mg/kg b.w)	21.2 ± 1.2	21.2 ± 1.5	19.7 ± 1.2	19.6 ± 1.1
EtOH diet + JGJ (100 mg/kg b.w)	20.7 ± 1.4	21.1 ± 1.4	19.6 ± 1.0	19.2 ± 0.9
EtOH diet + JGJ (200 mg/kg b.w)	21.6 ± 1.3	21.3 ± 2.3	20.1 ± 2.0	19.8 ± 1.2

Data are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM, n=10). Statistical analyses were different values according to the one-way ANOVA with Tukey's range test (Control diet vs EtOH diet $###p < 0.001$).

2. 자금정 투여에 따른 알코올로 인한 간독성에 대한 효과

자금정 투여가 알코올에 의해 유도된 간 손상에 대한 간보호에 미치는 영향을 확인하였다. 먼저 간의 중량을 측정하고 몸무게 대비 간의 무게를 확인한 결과, 알코올 식이로 급이 시킨 마우스는 유의적으로 증가되었으며, 알코올 식이에 자금정을 투여한 마우스는 알코올 식이만 급이한 마우스보다 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 2A). 또한 간보호 효과를 조직학적으로 확인하기 위해서 H&E 염색을 진행한 결과, 에탄올 식이를 급이 한 그룹의 간 조직

에서 희미한 미세 소포성 지방증이 관찰되었으며, 염증 및 괴사 등의 병변을 확인하였다. 이러한 알코올로 인한 간 조직학적 변화는 자금정을 투여한 마우스에서 유의하게 억제되었다(Figure 2B). 간 기능 및 손상 정도를 나타내는 혈청 AST 및 ALT 활성을 측정된 결과, 알코올 식이 투여로 혈청 AST 및 ALT 활성은 유의적으로 증가하였으며, 알코올로 인해 증가한 AST 및 ALT 활성이 자금정 200 mg/kg를 투여한 그룹에서 유의적으로 감소하였다(Figure 2C, 2D).

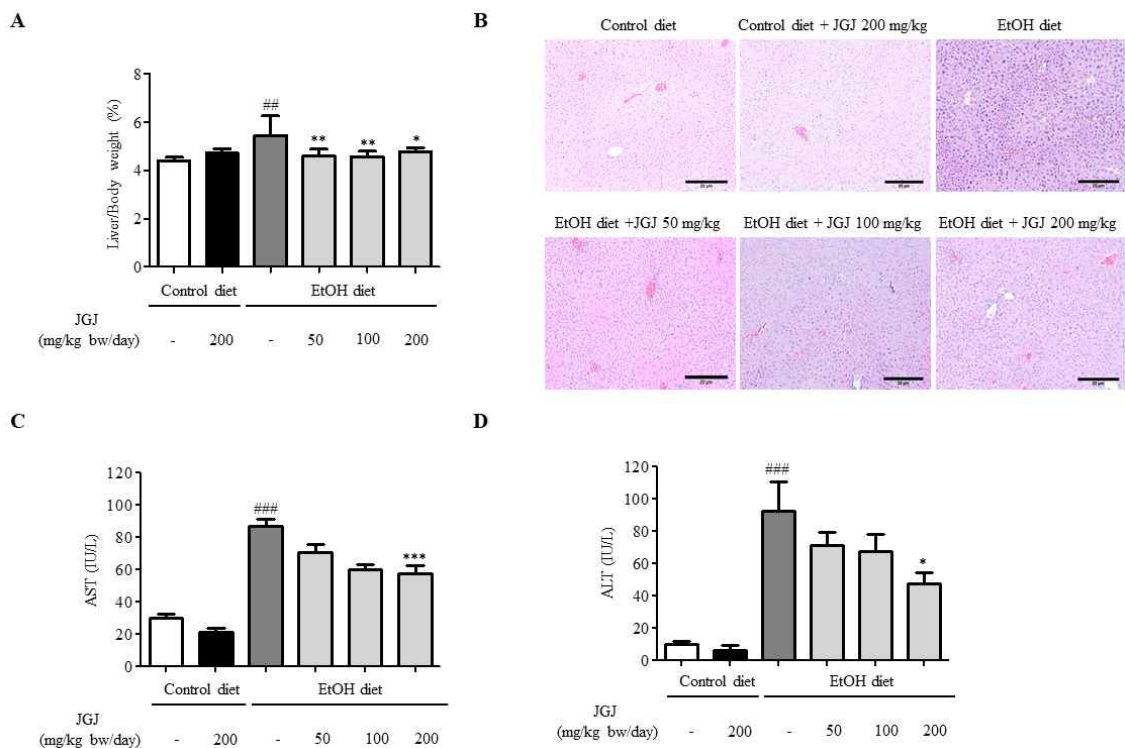


Figure 2. Effects of Jageum-Jung on ethanol-induced liver injury. (A) Liver/body weight (%). (B) H&E-stained liver sections of EtOH-induced liver injury model, visualized at 100 \times , n=10. (C) Activities of serum ALT. (D) Activities of serum AST. Data are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM, n=10). Statistical analyses were different values according to the one-way ANOVA with Tukey's range test (Control diet vs EtOH diet $###p<0.001$; EtOH diet vs EtOH diet+JGJ $***p<0.001$, $*p<0.05$).

3. 자금정 투여에 따른 알코올로 인한 Triglyceride 및 Total Cholesterol 측정에 대한 효과

간 조직에서 Triglyceride 및 Total Cholesterol 함량을 측정된 결과, 알코올 식이 급이에 의해서 간

에서 Triglyceride 및 Total Cholesterol의 상당한 축적을 유도 하였다. 알코올에 증가하였던 Triglyceride의 함량은 자금정 투여로 인하여 명농도 의존적으로 감소되었고(Figure 3A), 반면, 증가하였던 total cholesterol

의 함량은 자금정을 200 mg/kg로 처리하였을 때만 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3B). 이러한 결과

는 자금정이 알코올성 지방증에 효과적 일 수 있음을 나타낸다.

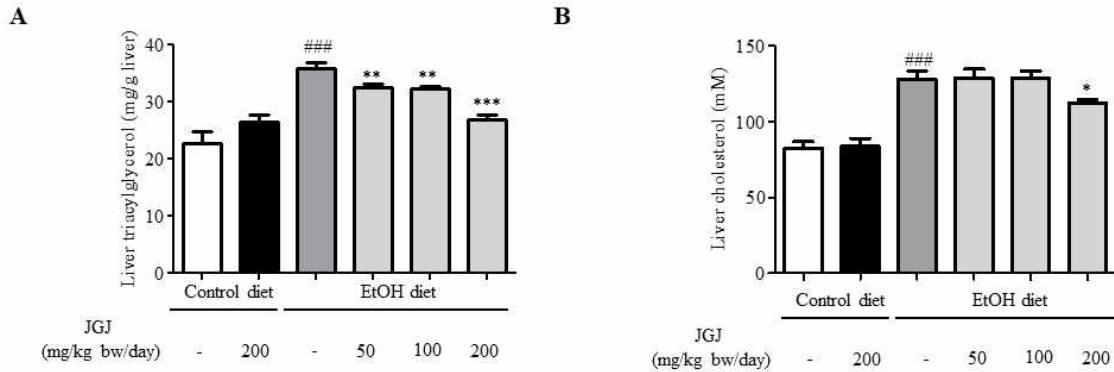


Figure 3. Effects of Jageum-Jung on alcoholic fatty liver disease. (A) Hepatic triacylglycerol levels. (B) Hepatic cholesterol levels. Data are shown as the mean±standard error of the mean (SEM, n=10). Statistical analyses were different values according to the one-way ANOVA with Tukey's range test (Control diet vs EtOH diet ###p<0.001; EtOH diet vs EtOH diet+JGJ ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05).

4. 자금정 투여에 따른 알코올로 인한 superoxide dismutase(SOD) 및 Glutathione (GSH) 활성화에 대한 효과

알코올에 의해 유도 되는 간 지질 과산화에 대한 자금정의 효과를 평가하기 위해, 대조군 마우스와 비교하여 혈청 SOD 및 GSH 농도의 수준을 확인하였

다. 알코올에 의해서 SOD 및 GSH의 함량이 감소하는 것을 확인하였으며, 자금정을 농도 의존적으로 처리한 결과, 알코올에 의해 유도 된 SOD 및 GSH 고갈을 유의하게 억제한 것을 확인하였다(Figure 4A, 4B).

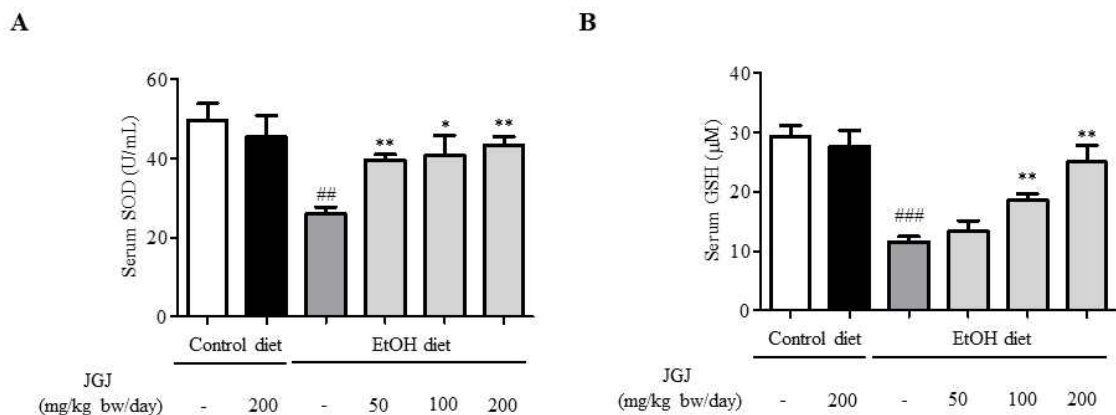


Figure 4. Effects of Jageum-Jung on liver antioxidant defense. (A) Activities of serum superoxide dismutase (SOD) (B) Activities of serum glutathione (GSH). Data are shown as the mean±standard error of the mean (SEM, n=10). Statistical analyses were different values according to the one-way ANOVA with Tukey's range test (Control diet vs EtOH diet ###p<0.001, ##p<0.01; EtOH diet vs EtOH diet+JGJ **p<0.01, *p<0.05).

5. 자금정 투여에 따른 알코올로 인한 Alcohol Dehydrogenase (ADH) 활성에 대한 효과

자금정 투여에 의해 Alcohol Dehydrogenase (ADH) 활성에 대한 효과를 확인한 결과, 알코올 식

이로 혈청 내 ADH의 활성은 유의적으로 감소 하였으며, 알코올로 인해 감소한 ADH의 활성은 자금정에 의해 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 5).

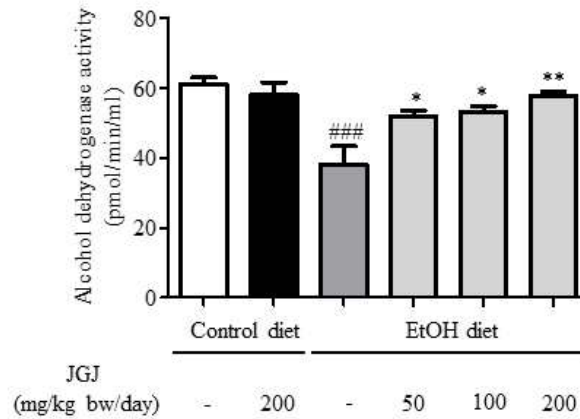


Figure 5. Effects of Jageum-Jung on alcohol dehydrogenase activity (ADH). Data are shown as the mean±standard error of the mean (SEM, n=10). Statistical analyses were different values according to the one-way ANOVA with Tukey's range test (Control diet vs EtOH diet ###p<0.001; EtOH diet vs EtOH diet+JGJ **p<0.01, *p<0.05).

IV. 고찰

알코올성 간질환의 임상 상황과 완전히 유사한 간 병리를 확립하기 위해 설치류 및 경구 투여는 효과적이고 정확한 동물 모델이다¹⁷⁾. 10일간의 알코올 섭취는 혈청내 ALT, AST, triglyceride 및 cholesterol의 수준은 모두 유의하게 증가 하였다. 실험 종료 후, 혈액 및 간 조직을 수집하였다. 알코올을 섭취한 군에서 일반 식이를 섭취한 군보다 식이의 소비가 감소되었다(Table 1). 본 연구에서 알코올 처리 후 마우스의 체중이 감소하였고, 자금정의 투여로 인한 체중 변화에는 유의적인 결과를 나타내지 않았다(Table 2). ALT 및 AST는 간 세포에서 중요한 대사 효소이며 일반적으로 혈장에서 낮은 수준이다. 따라서 혈청 ALT 및 AST는 보통 간 손상을 진단하기 위한 최적의 마커로 간주된다¹⁸⁾. 본 연구에서, 알코올 투여 후 ALT 및 AST 수준의 유의미한 증가가 얻어졌으며 (Figure 2), 이는 알코올 처리가 혈장 및 간세포를 손상시킬 수 있음을 나타낸다. 자금정의 전처리 는 200 mg/kg의 농도에서 ALT 및 AST 상승을 약화시

켰다(Figure 2).

이전 연구에 따르면 지방 축적은 알코올로 섭취로 인한 간 세포에서 보편적이며 복잡한 과정을 통해 이루어진다^{19,20)}. 본 연구에서, 알코올 그룹에서 혈청 내 triglyceride 및 cholesterol 함량은 정상 대조군에서와 비교하여 유의하게 증가하였으며, 자금정의 전처리로 인해 유의하게 감소시켰다 (Figure 3). H&E 염색을 통해 간 조직을 관찰한 결과, 알코올에 의해 손상이 자금정 처리 (50, 100 및 300 mg/kg)로 인해 병리학적 병변을 회복시켰다(Figure 2). 과도한 알코올 섭취는 산화 스트레스를 유도하여 항산화 방어를 손상시키고 동시에 활성산소종을 생성시킨다²¹⁾. 혈청내 SOD 및 GSH 함량을 측정함으로써 알코올에 의해 유발된 산화 손상을 검출 하였다. 알코올 처리는 대조군과 비교하여 혈청내에서 1.9배 적은 SOD 수준 및 신장 조직에서 2.5배 적은 GSH 수준을 나타냈다. 대조적으로 자금정을 전처리 하였을 때, 농도 의존적으로 회복하는 것을 확인하였다 (Figure 4). 마지막으로 간에서의 알코올 대사에 자금정의 효과를 확인하기 위해 Alcohol dehydrogenase (ADH)의 활성을 측정하였다. 알코올에 의해 감소하

있던 ADH의 활성이 자금정을 투여함으로 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과를 미루어 자금정의 처리는 항산화 효능 뿐만 아니라 알코올에 의한 숙취해소를 개선하는 것으로 사료된다.

V. 결론

마우스에서의 자금정의 경구 투여가 알코올로 인한 급성 간독성 상태에서 간보호 효과에 대한 영향을 조사 하였다. 알코올 식이 투여를 통해 급성 알코올 간독성을 유발한 후 간 조직 형상, 간 기능 지표(ALT, AST), 혈청내 Triglyceride, cholesterol, GSH 및 SOD의 함량, ADH의 활성을 조사하였다. 그 결과, 자금정의 경구 투여는 알코올로 유발된 급성 간독성 상태에서 간 조직내 지방의 축적을 완화 하였고, 혈청 AST, ALT 수치를 개선하였으며, 간조직 내 항산화 물질인 SOD 및 GSH의 농도를 증가시켰다. 더불어 지방 축적과 관련하여 triglycerid 및 cholesterol의 함량도 감소시켰으며, 숙취개선 효과로 ADH의 활성도 증가시켰다. 따라서 자금정은 알코올로 유발된 산화 스트레스, 숙취반응에 대한 간보호 효과 가능성을 나타내는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 대구광역시 메디시티기금 한방고유처방 자금정 효능 과학화 및 연구사업의 연구비(No. G17060) 지원과 한국한의학연구원 주요사업(KSN1812101)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Kim JW, Jeon SH, Jung HS, Kang KH, Lee IS, Lee SH, et al., HyungSang medical approach to detoxification. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*, 2009;23(2): 278-87.
2. Cho YK, Jeon JY, Shin YJ, Seol JK, Rhee JH, Won JH, et al., Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest by Jageum-Jung in HepG2 Hepatoma Cells. *The Journal of Internal Korean Medicine*, 2007;28(4):694 - 708.
3. Park IW, Kim HY, Cheon JH, Shih YH, Sah BS, Kim KB. Case Series Study about the Effect of Jageum-Jung on Atopic Dermatitis. *The Journal of Pediatrics of Korean Medicine*, 2018;32(1):11-8.
4. Yang JH, Do HJ, Lee E, Yim NH, Cho WK, Park KI, et al., Jageum-Jung improves 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice and suppresses pro-inflammatory chemokine production by inhibiting TNF- α /IFN- γ -induced STAT-1 and NF κ B signaling in HaCaT cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018;221:48-55.
5. Choi JY, Ahn SH, Shih YH, Sa BS, Kim KB. Mitigating Effect of Jageum-jung on Dextran Sulfate Sodium-induced Ulcerative Colitis through Anti-inflammatory Regulation. *The Journal of Internal Korean Medicine*, 2017; 38(6):944-54.
6. Lee DS, Min TS, Lee DS. Antiviral activity of methanol extract from *Rhus chinensis* gall. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 2018;61(4):379- 82.
7. Cha BC, Lee SB, Rhim TJ, Lee KH. Antioxidative and Hepatoprotective Effect of Compounds Isolated from *Galla Rhois*(*Rhus javanica* Linne. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 2000;8(2):157-64.
8. Song GY, Park BJ, Kim SH. Antithrombotic effect of *Galla Rhois*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 2002;33:120-3.
9. Ha HJ, Kim YJ, Kweon KT, Kim JJ. Review of the domestic research trends in the study of Korean herbal medicine with anti-inflammation effects. *The Korea Journal of Herbology*, 2011;26(4):15-22.
10. Taneja V, Siddiqui HH, Arora RB. Studies on the antiinflammatory activity of *Moschus moschiferus* (musk) and its possible mode of action. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1973;17(3):241-7.
11. Cochrane J, Chen H, Conigrave KM, Hao W. Alcohol use in China. *Alcohol Alcoholism*

- (Oxford, U.K.), 2003;38:537-42.
12. Neuman MG. Cytokine-central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Research & Health*, 2003;27:307-16.
 13. Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. Alcoholic liver disease: pathologic, pathogenetic and clinical aspects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1991;15:45-66.
 14. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006;290:G852-8.
 15. Lieber CS. Cytochrome P-4502E1: Its physiological and pathological role. *Physiological Reviews-American Journal of Physiology*, 1997;77:517-44.
 16. Amen Y, Sherif AE, Shawky NM, Abdelrahman RS, Wink M, Sobeh M. Grape-Leaf Extract Attenuates Alcohol-Induced Liver Injury via Interference with NF- κ B Signaling Pathway. *Biomolecules* 2020;10(4):558.
 17. Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nature Protocols*, 2013;8(3):627-37.
 18. Lee EH, Baek SY, Kim KY, Lee SG, Kin SC, Lee HS, et al., Effect of Rheum undulatum Linne extract and Glycyrriza uralensis Fischer extract against arachidonic acid and iron-induced oxidative stress in HepG2 cell and CCl4-induced liver injury in mice. *Herbal Formula Science*, 2016;24(3):163-74.
 19. Bi L, Jiang Z, Zhou J. The role of lipin-1 in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. *Alcohol Alcoholism (Oxford, U.K.)*, 2015; 50:146-51.
 20. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2017;14:343-55.
 21. Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farrè S, et al., Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Molecular Aspects of Medicine*, 2004;25:191-8.