

Preventive Effect of Poricoic Acid against Nonalcoholic Steatohepatitis

Hae Ran Kim, Dae Young Jung, Say Kim and Myeong Ho Jung*

Division of Longevity and Biofunctional Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 50612, Korea

Received October 25, 2022 / Revised December 24, 2022 / Accepted December 27, 2022

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the progressive stage of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) that highly increases the risk of cirrhosis and liver cancer, and there are few therapeutic options available in the clinic. Poricoic acid (PoA), a component of *Poria cocos* Wolf, has a wide range of pharmacological activities; however, little is known about its effects on NASH. The preventive effects of PoA on NASH were examined *in vivo* and *in vitro* by analyzing triglyceride synthesis, inflammation and fibrosis. In the high fat and methionine-choline deficient diet (HFMCD)-induced NASH mice, PoA reduced the liver weight and the levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase compared with non-treated HFMCD group. The staining with Oil Red O and hematoxylin and eosin revealed that PoA administration reduced red staining and the size of lipid droplet. qPCR analysis showed that PoA also reduced the expression of genes related to triglyceride synthesis. Further, immunostaining with CD68 and qPCR analysis revealed that PoA reduced the staining with CD68 and the expression of inflammatory genes induced by HFMCD. Moreover, PoA reduced the staining with sirius red and antibody of α -smooth muscle actin and also reduced the expression of genes related to fibrosis. The treatment of PoA to AML12 cells reduced the increase in triglyceride amount and expression of genes associated with triglyceride synthesis, inflammation and fibrosis. Taken together, our study indicate that PoA has therapeutic effect on NASH through preventing triglyceride synthesis, inflammation and fibrosis.

Key words : Fibrosis, inflammation, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), Poricoic acid, triglyceride synthesis

서 론

비알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올의 섭취와 무관하게 간 조직에 중성지방(triglyceride)이 비정상적으로 축적되어 유도되는 단순 지방간(simple steatosis)과 여기에 염증(inflammation), 산화적 스트레스(oxidative stress), 간 섬유화(fibrosis)까지 더해져서 발병되는 지방간염(steatohepatitis), 나아가 간경변(cirrhosis)과 간암까지 진전되는 질환이다[11]. 단순히 간에 지방이 축적되는 지방간(steatosis)과는 달리 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)은 간 내 염증 및 섬유화를 특징으로 하며, 환자의 20% 정도가 간경화(cirrhosis)로 진행하고 이후 간암까지 진행되는 것으로 알려져 있다[9]. 따라서 비알코올성 지방간염은 단순 지방증

과 달리 팽창성 변성(ballooning degeneration) 및 세포 사멸, 염증성 침윤 등의 병리학적 소견을 보는 것으로 알려져 있다[2]. 비알코올성 지방간염의 발병 기전은 2단계 가설을 따르는 것으로, 첫 번째 자극은 간 내 중성 지방 축적을 말하는데, 이는 비만(obesity), 인슐린 저항성(insulin resistance), 신생 지방생성(*de novo* lipogenesis) 등이 주요 원인으로 작용하여 간 조직내 중성 지방의 침착이 일어나며, 2번째 자극으로는 염증반응, 산화적 스트레스, 세포사멸(apoptosis) 등 다양한 자극들에 의해 간 섬유화, 나아가 간경변들의 병증으로 발전하게 된다[11]. 비알코올성 지방간염은 비알코올 관련 지방간 질환의 약 25%에서 발생하는데 비해, 비알코올성 지방간염의 진행을 차단할 수 있는 효과적인 치료제는 개발되지 못한 상황이다.

복령(*Poria cocos* Wolf)는 소나무 뿌리에 기생하는 균핵으로, 가운데로 소나무 뿌리가 관통되어 있으며 질은 단단하다[10]. 복령은 완만한 이뇨작용이 있어 소화기가 약하면서 전신에 부종이 있을 때에 효과가 뛰어나며, 신장염·방광염·요도염에도 효과가 있다[10]. 또한 거담 작용이 있어서 가래가 많이 분비되고 호흡이 곤란한 증상인 만성기관지염과 기관지확장증에도 거담, 진해하는 약물과 배합하여 사용되고 있으며, 건위 작용이 있어서 위장

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8468, Fax : +82-51-510-8437

E-mail : jung0603@pusan.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/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

내에 수분이 과다하게 정체되어 복부가 팽만되고 구토를 일으키는 만성위장염에 사용되었다[10]. 이외에 복령은 항산화, 항염증, 항노화, 항당뇨, 항암 등 다양한 범위의 질환에 응용이 가능한 것으로 알려져 있다[8]. 최근 본 연구실에서는 복령의 추출물이 비알코올성 지방간(hepatic steatosis)을 개선함을 보고한 적이 있다[5]. 복령의 주요 성분으로는 다당류(polysaccharides), 트리테펜(triterpenes), 스테로이드(steroids)인데, 다당류로서는 β -1,3-glucan의 pachyman이 주성분이며, triterpene carboxylic acid로서는 poricoic acid, pachymic acid, polyporenic acid, tumulosic acid, eburicoic acid 등이 있으며, 스테로이드로서는 ergosterol이 있다[8, 10]. Poricoic acid (PoA)는 앞서 설명한 바와 같이 복령의 주요 성분으로 triterpenes 계에 속하는 물질로, 주로 항암작용 등이 많이 보고되었으나[1, 4, 6], 비알코올성 지방간 질환의 치료 효능에 관해서는 보고된 적이 없다.

따라서, 본 연구에서는 한약 소재 복령의 천연 성분인 PoA가 비알코올성 지방간염의 발병 기전(중성지방 생성, 염증 및 섬유화)에 다중적으로 작용하여 비알코올성 지방간염을 치료하는 효능이 있는지를 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통해 연구하였다.

재료 및 방법

시약 준비

본 실험에 사용한 Poricoic acid는 ChemFaces (Wuhan, China)에서 구입하였고, palmitate는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. AML12 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, CL-173TM; Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), fetal calf serum (FCS)은 HyClone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. AML12 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 ITS (insulin-transferrin-selenium, Gibco)와 40 ng/ml dexamethasone (Sigma-Aldrich)이 포함된 배지에서 배양하였다. Aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 분석에 사용된 정량용 kit는 아산 제약(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

동물실험

실험에 사용된 마우스는 6주령 수컷 C57BL/6 (두얼바이오텍, Seoul, Korea)로 실험 환경은 항온($24\pm 2^\circ\text{C}$), 항습($55\pm 5\%$)을 유지하고 12시간 간격으로 light-dark cycle을 일정하게 유지하였다. 식이와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였고, 체중은 이틀에 한번씩 측정하였다. 일주일간 사육 환경에 적응시킨 뒤 mouse의 체중에 따라 난괴법에 의해 각 군당 9마리씩 총 5개의 군으로 나누었다. 각 실험

군은 9마리로 cage당 3마리씩 분리하여 사육하였다. 정상군은 정상식이(normal diet, ND)를 한 군이고, 실험군은 총 칼로리의 60% 고지방(high fat)과 0.1% methionine과 0% choline이 포함된 식이(60 kcal% fat, no added choline, and 0.1% methionine, HFMC)로 식이한 군이며, 이를 다시 생리 식염수에 용해시킨 PoA를 0, 5, 10, 20(mg/Kg body weight)의 농도로 투여한 군으로 나누어, 총 실험군은 4그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. PoA는 총 6주 동안 투여하였으며, 모든 동물 실험은 부산 대학교 연구동물윤리위원회의 지침에 따라 수행하였다(Approval no. PNU-2020-2711).

조직 채취 및 조직학적 분석

실험 동물은 13시간 동안 금식시켜 CO_2 로 안락사 시킨 후 간 조직을 채취하였다. 간은 적출 후 멸균된 phosphate buffered saline로 세척하고 수분을 제거하여 무게를 측정하였다. 간 조직은 4% formalin으로 고정하였으며, 탈수된 조직은 파라핀에 심어 4 μm 두께로 박절한 후 절편 슬라이드를 제작하여 Oil red O (ORO), hematoxylin and eosin (H&E), sirius red로 시료를 염색하였다. 또한 CD68과 α -smooth muscle actin (SMA) 항체를 가지고 면역염색(immunostaining)을 행하였다. 유전자 발현 분석을 위해서, 간 조직은 작게 조각 내어 1.5 ml 마이크로 튜브에 담아 액체 질소에 넣고 급속 냉동 후 -80°C 에 보관 후 분석하였다.

혈중 ALT 및 AST 농도 측정

채취한 혈액은 4°C 에서 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 혈청은 -80°C 에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 혈청 중 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST) 활성은 효소법에 의한 정량용 kit (Cat. No. AM102, AM103; 아산 제약)를 이용하여 측정하였다. ALT 및 AST 측정은 기질액과 혈청을 반응시킨 뒤 정색 시약을 넣고 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도를 측정하였다. ALT 및 AST는 표준액을 이용하여 표준 곡선을 그려 ALT 및 AST 함량을 산출하였다.

RNA 분리 및 qPCR

Total RNA는 TRIzol® (Ambion Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 분리하였으며, 분리한 2 μg total RNA로부터 TOPscript™ RT DryMIX (Enzymomics, Daejeon, South Korea)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real time PCR분석은 SYBR Green master mixture (SJ Bio Sciences, Daejeon, Korea)을 사용하여 분석하였고, 각 유전자에 특이적인 primer들로 PCR을 행하였다.

세포 독성시험(Cytotoxicity assay)

세포의 독성(cytotoxicity) 시험은 3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용해 분석하였다. 1×10^4 개의 AML12 세포를 96-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 각 well에 MTT (1 mg/ml)을 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 추가 배양하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

중성지방(triglyceride, TG) 측정

AML12 세포 현탁액을 750 μ l chloroform/methanol/H₂O (8:4:3, v/v/v) 용액과 혼합하여 균질화한 후 균질화된 세포 현탁액을 1시간 동안 상온에서 추출하였고, 이후 800xg에서 10분간 원심분리하였다. 중성지방이 포함된 유기용매층은 8시간 동안 마른 상태가 될 때까지 유지한 후 에탄올 용액에 녹여 사용하였다[7].

통계학적 분석

이 연구에서 사용된 모든 data는 mean \pm SD 값으로 표기하였다. Data는 ANOVA를 이용해 분석하였으며, mean difference는 Tukey-Kramer post-hoc 테스트를 이용해 분석하였다. 결과값은 $p < 0.05$ 일 때 유효함을 평가하였다.

결 과

HFMCD로 식이한 쥐에서 PoA에 의한 몸무게와 간 무게 변화

각 군별 식이양, 체중 증가량, 간 조직 무게 등을 측정된 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 식이양에는 정상군과 HFMCD 식이한 군 모두에서 큰 변화가 없었으며(Fig. 1A), 체중은 정상 식이를 한 정상군보다 HFMCD 식이한

실험군 모두에서 감소하였으며(Fig. 1B), 이에 따른 체중 증가 역시 감소하였다(Fig. 1C). 이와 같은 결과는 methionine choline deficient diet (MCD) 식이는 일반적으로 체중을 감소시킨다는 보고와 일치하였다. 간 무게를 측정된 결과 HFMCD에 의해 간의 무게가 유의성 있게 증가하였고(Fig. 1D), 이와 같은 증가는 PoA의 투여에 의해 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1D). 간 무게를 체중의 무게로 나누었을 때도 HFMCD에 의해서 유의성 있게 증가하였으나(Fig. 1E), PoA의 투여에 의해 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1E).

HFMCD로 식이한 쥐에서 PoA에 의한 간 독성 변화 분석

PoA가 HFMCD에 의해 유도되는 간 독성을 억제하는지를 알기 위해, 혈중 ALT, AST를 측정하였다. 각 군별 혈중 ALT 및 AST의 농도를 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 ALT를 측정 결과, HFMCD로 식이하고 PoA를 투여하지 않은 군(HFMCD + PoA 0 mg/kg)은 정상 식이군에 비해 ALT가 유의성 있게 증가하였으나 PoA의 투여에 의해 유의성 있게 ALT를 감소시켰다(Fig. 2A). AST를 측정된 결과에서도 ALT의 측정 결과와 동일하게 HFMCD로 식이하고 PoA를 투여하지 않은 군에서는 정상 식이군에 비해 ALT가 유의성 있게 증가하였으나, PoA를 투여한 군에서 ALT 수치가 유의성 있게 감소됨을 확인하였다(Fig. 2B).

HFMCD로 식이한 쥐에서 PoA에 의한 간 조직내 중성지방 변화 분석

PoA가 HFMCD에 의해 증가하는 중성지방 생성을 억제

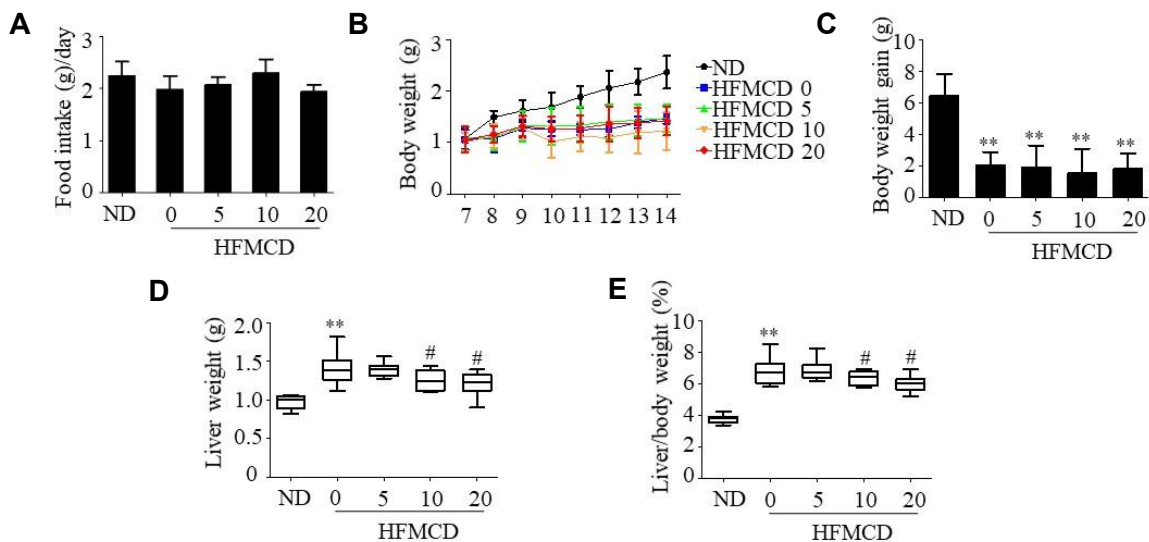


Fig. 1. Effects of Poricoic acid on body weight and liver weight in HFMCD fed mice. (A) amount of food intake. (B) Body weight. (C) Body weight gain. (D) Liver weight. (E) Ratio of liver weight/body weight. Data are presented as the mean \pm SD of nine mice. ** $p < 0.01$ vs normal diet (ND)-fed mice, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. HFMCD-fed mice. ND; normal diet. HFMCD; high fat and methionine-choline deficient diet.

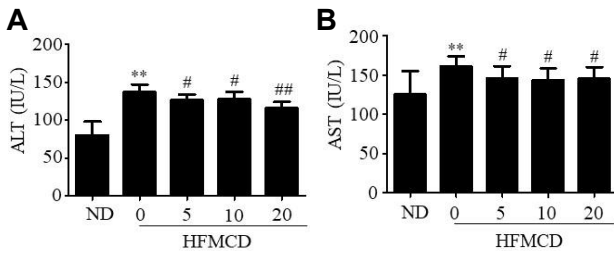


Fig. 2. Poricoic acid attenuates HFMCD-induced liver toxicity in HFMCD fed mice. The levels of ALT (A) and AST (B) were measured from liver lysates. Data are presented as the mean ± SD of nine mice. ***p*<0.01 vs normal diet (ND)-fed mice, #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs. HFMCD-fed mice.

하는지를 분석하기 위해, 간 형태의 변화, ORO 및 H&E 염색과 중성지방 합성과 관련된 유전자들의 발현을 측정하였다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 PoA을 투여하지 않은 HFMCD군에서는 정상 식이의 군에 비해 간의 색깔이 갈색에서 노란색으로 변한 것을 확인할 수 있는데, 이는 HFMCD에 의해 간에 중성지방의 집착이 일어났음을 알 수 있었다. 그러나 HFMCD에 PoA을 같이 식이한 군에서는 PoA에 의해 간의 색깔이 노란색에서 다시 정상적인 갈색으로 변화되는 것이 관찰되었다. 이는 HFMCD에 의해 유도되는 중성지방의 생성이 PoA에 의해 감소되는 것

으로 판단하였다. 이를 다시 확인하기 위해, 간 조직을 ORO 및 H&E 염색을 한 결과, Fig. 3B에서 보는 바와 같이 PoA을 투여하지 않은 HFMCD 식이군에서는 정상식이 군에 비해 ORO 염색이 증가하였으나 PoA을 같이 투여한 군에서는 ORO 염색이 감소하였고, H&E 염색에서도 PoA을 투여하지 않은 HFMCD 식이군에서는 지방구의 크기가 정상식이 군에 비해 증가하였으나, PoA을 같이 투여한 군에서는 지방구의 크기가 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 또한 중성지방 합성과 관련된 유전자의 발현을 측정 한 결과, PoA을 투여하지 않고 HFMCD만으로 식이한 군에서는 serum response element binding protein 1c (SREBP1c), fatty acid synthase (FAS), stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1), acetyl CoA carboxylase 1 (ACC1) 등의 유전자 발현이 정상 식이 군에 비해 증가하였다(Fig. 3C). 그러나 PoA을 같이 투여한 군에서는 HFMCD만으로 식이한 군에 비해 중성지방 합성 관련 유전자 발현이 감소함을 확인하였다(Fig. 3C).

HFMCD로 식이한 쥐에서 PoA에 의한 간 조직내 염증 반응 분석

PoA가 HFMCD에 의해 유도되는 염증반응을 억제하는 지를 분석하기 위해, 간 조직에서 CD68 항체로 면역 조직학적 염색을 하였고, 또한 염증 관련 유전자의 발현을 측

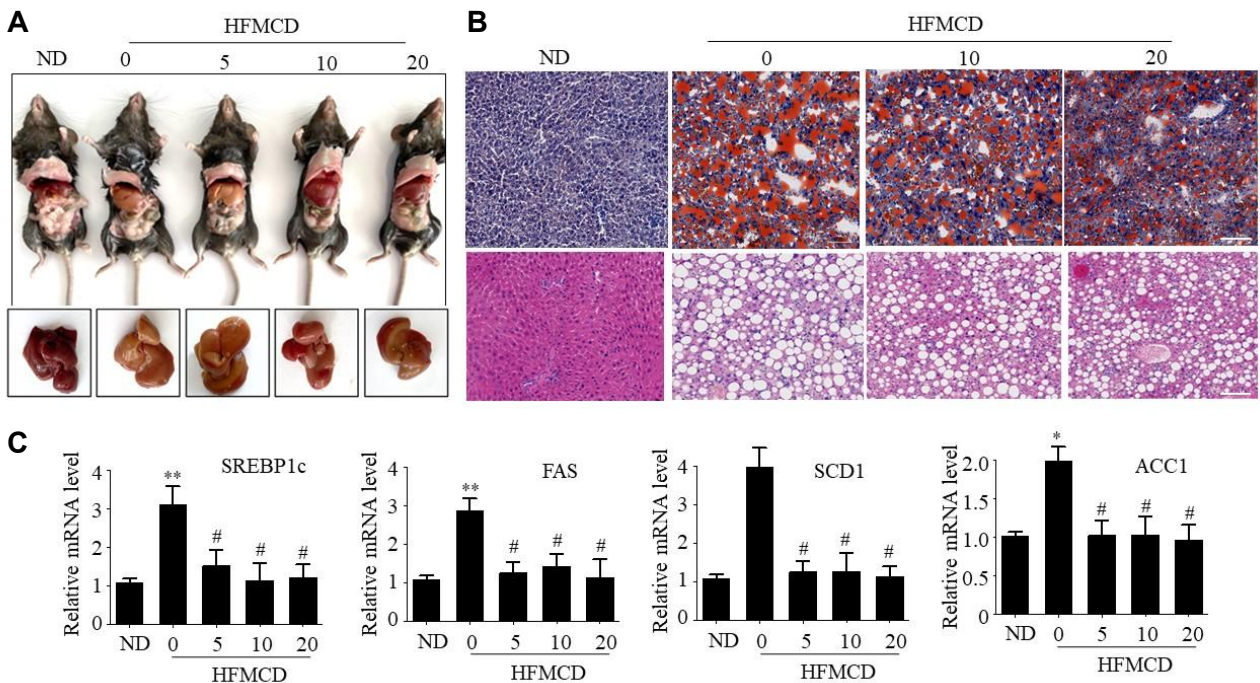


Fig. 3. Poricoic acid ameliorates HFMCD-induced hepatic steatosis in HFMCD fed mice. (A) Representative images of liver morphology. (B) Oil Red O staining and H&E staining. Representative images were shown. A scale bar is 100 μm. (C) Relative mRNA levels of triglyceride synthesis-related genes including SREBP1c, FAS, SCD1 and ACC1. Data are presented as the mean ± SD of nine mice. **p*<0.05, ***p*<0.01 vs normal diet (ND)-fed mice, #*p*<0.05 vs. HFMCD-fed mice.

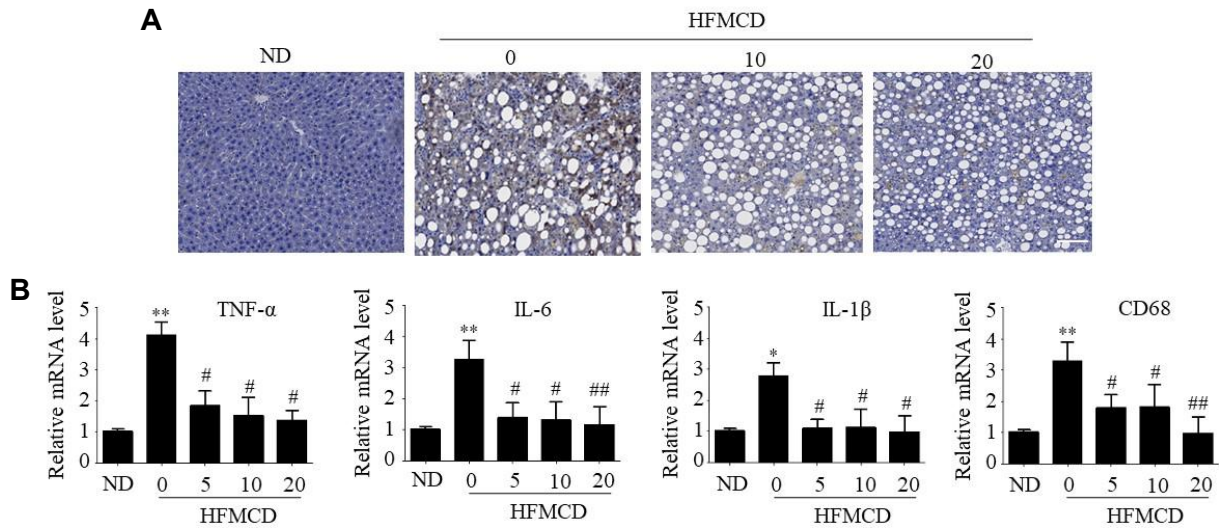


Fig. 4. Poricoic acid reduces HFMCD-induced inflammation in the liver of HFMCD fed mice. (A) CD68 staining. Representative images were shown. A scale bar is 100 μ m. (B) Relative mRNA levels of inflammatory genes including TNF α , IL-6, IL-1 β , and CD68. Data are presented as the mean \pm SD of nine mice. * p <0.05, ** p <0.01 vs normal diet (ND)-fed mice, # p <0.05, ## p <0.01 vs. HFMCD-fed mice.

정하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 PoA를 투여하지 않고 HFMCD만으로 식이한 군에서는 정상식이 군에 비해 CD68 염색이 증가하였다. 그러나 PoA를 같이 투여한 HFMCD군에서는 HFMCD만을 식이한 군에 비해 CD68 염색이 감소하였다(Fig. 4A). 또한 염증 반응과 관련된 유전자의 발현을 측정된 결과, PoA를 투여하지 않고 HFMCD만으로 식이한 군에서 tumor necrosis factor α (TNF α), interleukine 6 (IL-6), IL-1 β , CD68 등의 유전자 발현이 정상식이 군보다 증가하였다(Fig. 4B). 그러나 PoA를 HFMCD와 같이 투여한 군에서는 HFMCD만으로 식이한 군에 비해 염증 관련 유전자들의 발현이 감소되었다(Fig. 4B).

HFMCD로 식이한 쥐에서 PoA에 의한 간 조직내 섬유화 반응 분석

PoA가 HFMCD에 의해 유도되는 섬유화 반응을 억제하는지를 분석하기 위해, 간 조직을 sirius 염색과 α -SMA 면역 염색을 시행하였으며. 섬유화 관련 유전자의 발현도 측정하였다. 간 조직에서 sirius와 α -SMA 염색의 결과, Fig. 5A에서 보는 바와 같이 PoA를 투여하지 않고 HFMCD만으로 식이한 군에서는 정상식이 군에 비해 sirius 염색과 α -SMA 면역 염색이 증가하였으나 PoA를 같이 투여한 군에서는 HFMCD만으로 식이한 군에 비해 sirius 염색과 α -SMA 면역 염색이 감소하였다. 또한 섬유화 반응과 관련된 유전자의 발현을 측정된 결과에서도 PoA를 투여하지 않고 HFMCD만으로 식이한 군에서 α -SMA, collagen 1 α 1 (Coll1 α 1), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP1) 등의 유전자 발현이 정상 식이군에 비해 증가하였다. 그러나 PoA를 HFMCD와 같이 투여한 군에서는 HFMCD만으

로 식이한 군에 비해 섬유화 관련 유전자 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 5B).

Palmitate (Pa)로 처리한 AML12 간 세포에서 PoA에 의한 중성지방의 양 및 중성지방 합성 관련 유전자 발현 분석

In vivo 실험을 통해 PoA가 HFMCD 식이로 비알코올성 지방간염을 유발한 쥐에서 중성지방의 생성(지방간), 염증 및 섬유화 반응을 억제함을 확인하였다. 이와 같은 PoA의 비알코올성 지방간염 제어 효능을 *in vitro*에서 확인하기 위해, Pa로 처리한 AML12 세포에서 PoA가 중성지방의 생성(지방간), 염증 및 섬유화 반응을 억제하는지를 분석하였다. 먼저 본 실험에 앞서 PoA와 Pa에 대한 세포 독성을 측정하였다. Pa를 단독으로 처리하였을 때의 세포 독성을 MTT로 분석한 결과, Pa의 농도가 500 mg/ml까지 독성을 나타내지 않았다. 다음 Pa와 PoA를 함께 병행 처리하였을 때의 AML12 세포의 세포독성을 측정하였는데, Fig. 6A에서 보는 바와 같이 Pa의 농도를 100 mg/ml로 고정하고, PoA의 농도를 40 μ g/ml까지 증가시켜도 세포의 독성에는 큰 영향이 없었다. 따라서, 이 이후의 실험은 세포의 독성이 나타나지 않는 Pa의 농도 100 mg/ml과 PoA의 농도 5, 10 μ g/ml를 사용하였다. PoA가 AML12 세포에서 Pa에 의해 증가되는 중성지방을 억제하는지를 확인하기 위해, 중성지방의 양과 중성지방 합성 관련 유전자 발현으로 분석하였다. Fig. 6B에서 보는 바와 같이 Pa를 단독으로 처리한 세포에서는 중성지방의 양이 Pa를 처리하지 않은 세포에 비해 유의하게 증가하였으나, 10 μ g/ml PoA를 함께 처리하였을 때는 중성지방의 양이 감소하였다(Fig. 6B). 중성지방 합성 관련 유전자 발현을 측정하

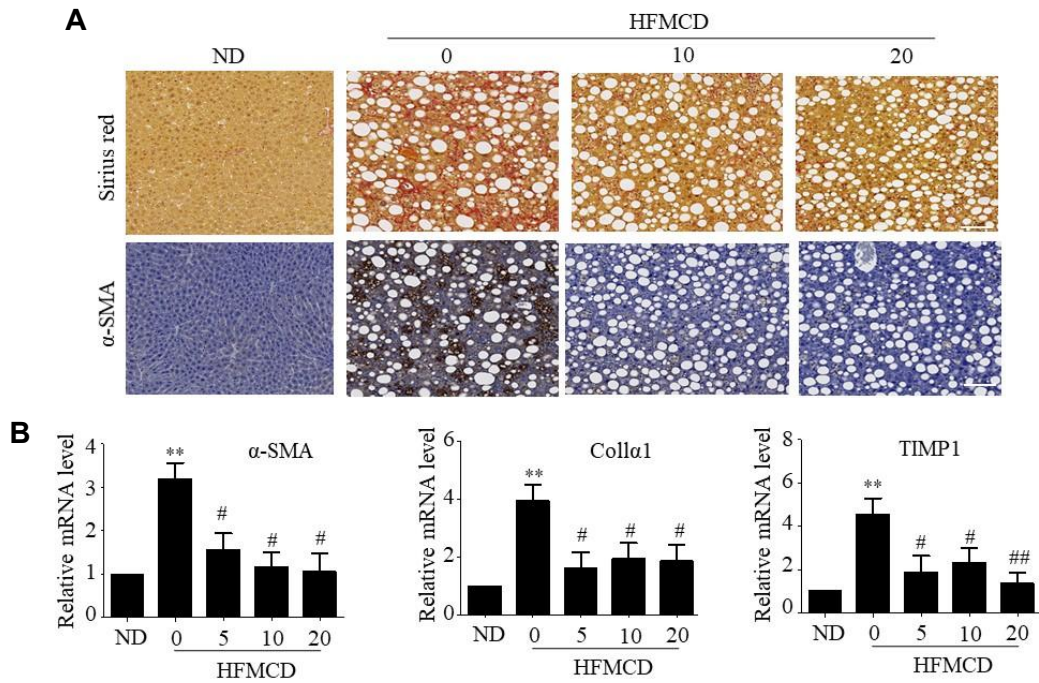


Fig. 5. Poricoic acid decreases HFMCDD-induced fibrosis in the liver of HFMCDD fed mice. (A) Sirius staining and α-SMA staining. A scale bar is 100 μm. (B) Relative mRNA levels of fibrosis genes including α-SMA, Coll1α1 and TIMP1. Data are presented as the mean ± SD of nine mice. ***p*<0.01 vs normal diet (ND)-fed mice, #*p*<0.05, ##*p*<0.01 vs. HFMCDD-fed mice.

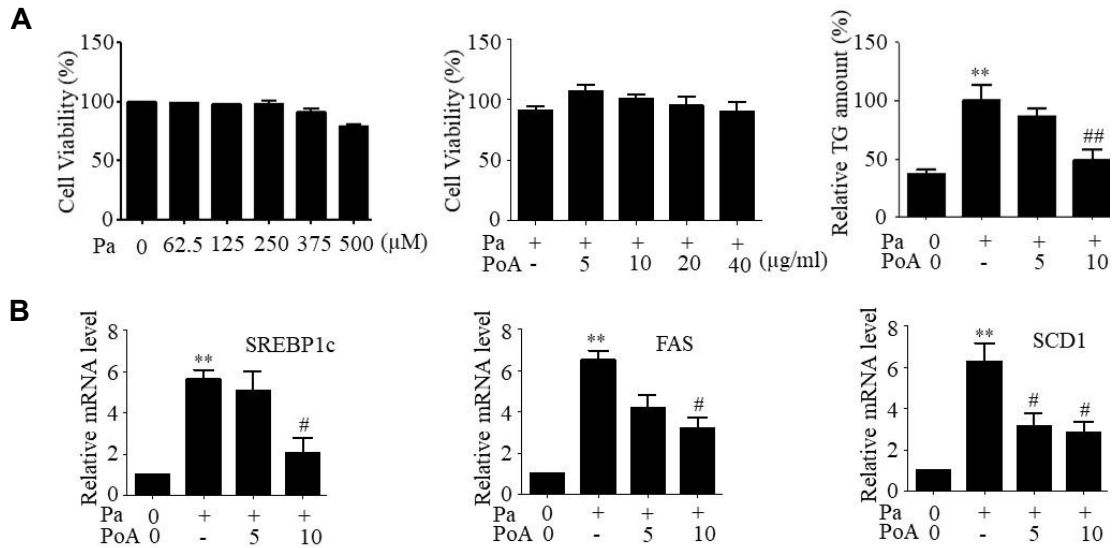


Fig. 6. Poricoic acid reduces palmitate-induced triglyceride amount and expression of lipogenesis genes in the palmitate-treated AML12 cells. (A) Cell toxicity of palmitate and poricoic acid on LX-12 cells. Cell viability was determined by MTT assay. (B) Intracellular TG amounts. (C) Relative mRNA expression of lipogenesis genes including SREBP1c, FAS and SCD1. Data represent mean ± SD of triplicate experiments. ***p*<0.01 versus non-treated control. #*p*<0.05 versus Pa-treated cells. Pa; palmitate. PoA; poricoic acid.

결과에서도 10 μg/ml PoA는 Pa 처리에 의해 증가하는 SREBP1c, FAS, SCD1 등의 중성지방 합성 관련 유전자 발현을 감소시켰다.

Palmitate (Pa)로 처리한 AML12 간 세포에서 PoA에 의한 염증 및 섬유화 관련 유전자 발현 분석

PoA가 Pa로 처리한 AML12 세포에서 Pa에 의해 증가되는 염증 및 섬유화 반응을 억제하는지를 확인하기 위해,

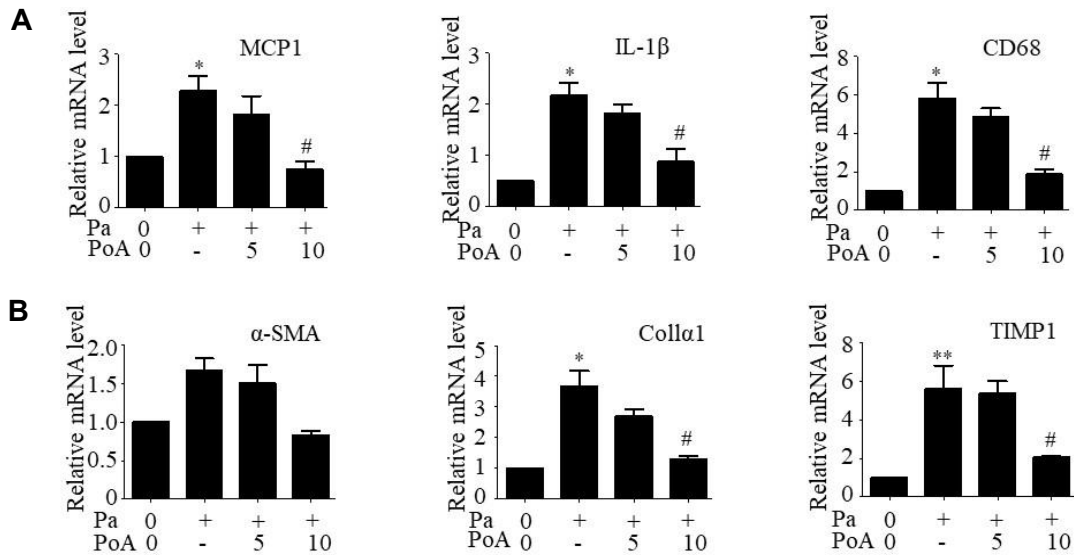


Fig. 7. Poricoic acid decreases palmitate-induced expression of genes related to inflammation and fibrosis in the palmitate-treated AML12 cells. (A) Relative mRNA levels of inflammatory genes including MCP-1, IL-1β and CD68. (B) Relative mRNA levels of fibrosis genes including α-SMA, Colla1 and TIMP1. Data represent mean ± SD of triplicate experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01 versus non-treated control. #*p*<0.05 versus Pa-treated cells.

염증 및 섬유화 관련 유전자 발현으로 분석하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 Pa는 AML12 세포에서 MCP1, IL-1β, CD68와 같은 염증 유전자(Fig. 7A)와 α-SMA, Colla1, TIMP1 같은 섬유화 관련 유전자(Fig. 7B)의 발현을 증가시켰으나 10 μg/ml의 PoA를 함께 처리하였을 때 이러한 유전자들의 발현 증가는 감소되었다(Fig. 7A, Fig. 7B).

고찰

비알코올성 지방간염은 지방 침착 및 간세포 손상을 반영하는 염증 및 간 섬유화 소견이 동반된 질환으로, 경변증과 간암의 원인 질환이 될 수 있다[11]. 비알코올성 지방간염은 서구식 식단 변화와 함께 우리나라에서도 매우 빠른 속도로 증가하고 있으며, 특히 미국의 경우 50세 미만에서 간이식을 받게 되는 가장 많은 원인으로 알려져 있다[11]. 모든 비알코올성 지방간 환자가 비알코올성 지방간염으로 진행하지는 않지만, 일단 지방간염으로 진행할 경우 간질환 및 이와 관련된 합병증으로 사망할 가능성이 높아 적극적인 검사 및 치료가 필요할 수 있다[15]. 그러나 현재 비알코올성 지방간염 치료제로 규제기관의 승인까지 도달한 약은 없는 실정이다[15]. 그런데 한약 제제는 부작용이 거의 없는 천연 약재로 한약 제제의 파이토 케미컬(phytochemical)은 효과적인 비알코올성 지방간염 치료제 개발을 위해 적용이 가능한 후보 물질이 될 수 있다. 복령은 구멍장이 버섯과(Polyporaceae)에 속하는 갈색부후균(brown-rot fungi)의 한 종류로, 소나무를 절제 한 5-6년 후 송근 주위에 기생하는 균핵으로, 담백색을

백복령, 담갈색을 적복령이라 한다. 복령의 주요 성분은 트리테르펜(triterpenes), 다당류(polysaccharides), 스테로이드(steroids)로 구성된 3개의 성분군으로 알려져 있는데. 이중 다당류의 약리작용이 다수 연구되었으며, 특히 항암, 항염증, 항산화 작용 등이 보고되었다[8]. PoA는 복령의 주요 성분으로 triterpenes계에 속하는 물질로, 주로 항암작용이 많이 보고되었으나[1, 4, 6] 비알코올성 지방간 질환의 치료 효능에 관해서는 보고된 적이 없다. 따라서 본 연구에서는 PoA가 비알코올성 지방간염에 대해 치료 효능이 있는지를 확인하기 위해 비알코올성 간염을 유발하는 식이로 비알코올성 지방간염을 유발한 쥐의 간 조직과 palmitate을 처리한 간 세포 AML12에서 중성지방 합성, 염증 및 섬유화 정도를 분석하였다.

비알코올성 지방간염의 병태생리는 2단계 가설을 따르는 것으로, 첫 번째 자극은 간 내 지방 축적으로 중성지방이 간 조직 내 침착이 일어나면 이어서 염증반응, 산화적 스트레스, 세포사멸 등 다양한 자극들에 의해 간 섬유화, 나아가 간경변으로 발전하게 된다[2, 15]. 그러므로 비알코올성 지방간염의 발병은 중성지방 합성, 염증 및 간 섬유화가 중요한 병인으로 알려져 있다. 이들 병인 중 중성지방 합성은 해당작용에서 생성되는 acetyl CoA가 citrate를 거쳐 세포질에서 ATP citrate lyase (ACLY), acetyl CoA carboxylase 1 (ACC1), fatty acid synthase (FAS), stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) 등에 의해 지방산이 합성되고, 합성된 지방산은 glycerol과 반응하여 diacylglycerol acyltransferase (DGAT)등에 의해 중성지방이 생성된다[3]. 이러한 중성지방합성에는 SREBP1c, ChREBP (carbohydrate

responsive element binding protein), LXR (Liver X receptor) 등의 전사인자들이 중성 지방 합성 유전자들의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다[3, 14]. 본 연구에서 ORO red 와 H&E 염색의 결과에 따르면, HFMCD로 식이한 쥐의 간 조직은 정상식이 군보다 중성지방의 집착이 일어나 지방간이 생성되었음을 확인하였다. 그러나 PoA는 HFMCD에 의해 증가되는 ORO red와 H&E 염색을 감소시켰다. 이는 PoA는 HFMCD에 의해 유도되는 비알코올성 지방간(hepatic steatosis)을 억제함을 확인할 수 있었다. 이를 더 증명하기 위해 앞서 설명한 중성지방 관련 유전자들의 발현을 측정된 결과, PoA는 HFMCD에 의해 증가하는 SREBP1c, FAS, SCD1, ACC1 등과 같은 중성지방합성 관련 유전자들의 발현을 감소시켰다. 이상과 같은 결과는 PoA는 비알코올성 지방간을 억제함을 확인할 수 있었다.

염증 반응은 비만에 의해 비대해진 지방조직에서 여러 종류의 inflammatory chemokines과 cytokine 들이 분비되어 간세포에 염증반응을 유도한다[12]. 또한 장에서는 장 박테리아에서 생성되는 lipopolysaccharide (LPS)가 쿠퍼 세포(Kupffer cell)를 자극하여 쿠퍼 세포 또는 간세포(hepatocyte)에 있는 toll like receptor 4 (TLR 4)을 자극하고 이에 따라 NFkB와 nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor protein3 (NLRP3) inflammasome을 활성화하여 IL (interleukine)-6, IL-8, IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Transforming growth factor β (TGF β)의 분비를 촉진하여 염증반응이 유발되는 것으로 알려져 있다[13]. 따라서 PoA가 비알코올성 지방간염의 억제 효능을 확인하기 위해, 간 조직에서 염증반응을 분석하였다. CD68 항체로 면역 염색으로 간 조직의 염증 반응을 분석한 결과, 정상식이 군에 비해 HFMCD로 식이한 군에서 CD68 염색이 증가하였으나 PoA는 HFMCD 식이에 의해 증가한 CD68 염색을 감소시켰음을 확인하였다. 또한 PoA는 간 조직에서 HFMCD로 식이에 의해 증가하는 TNF α , IL-6, IL-1 β 와 같은 염증 관련 유전자들의 발현도 감소시켰다. 이상과 같은 결과는 PoA는 비알코올성 지방간염에 중요한 병인으로 작용하는 염증 반응을 억제하는 작용을 함을 확인할 수 있었다.

간의 섬유화는 간 성상 세포(hepatic stellate cell, HSC)에서 일어나는데, 쿠퍼세포가 TGF β 를 분비함으로써 간 성상 세포가 활성화되는데, TGF β 외에도, 산화적 스트레스(oxidative stress), 염증 사이토카인(inflammatory cytokines) (LPS, TGF β 1, TNF α)들이 휴지 상태의 간 성상 세포를 자극하여 platelet derived growth factor (PDGF), matrix metalloproteinase 2/3 (MMP-2/3), TGF β 1, MCP-1 등을 분비하여 섬유화를 유도한다[12]. PDGF는 간 성상 세포의 증식을 촉진하며 MMP2/3는 extracellular matrix을 분해하며, TGF β 1는 collagen 생성을 유도한다. 또한 PDGF, MCP1은 HSC chemotaxis을 유발하는데, 간의 섬유화는 두 종류의 신호

기전 즉 TGF β -Smad3와 Hedgehog (HH) 신호에 의해 일어남이 보고되었다[13]. 따라서 PoA의 비알코올성 치료간염의 억제효능을 확인하기 위해 간 조직에서 섬유화 반응을 분석하였다. Sirius red 염색과 α -SMA 항체로 조직 염색하여 간 조직의 섬유화 반응을 분석한 결과, PoA는 HFMCD로 식이에 의해 증가한 sirius red 염색과 α -SMA 염색을 감소시켰다. 이와 같은 결과는 섬유화 관련 유전자의 발현을 측정된 결과와 동일하게 나타났다. 즉, PoA는 간 조직에서 HFMCD로 식이에 의해 증가하는 섬유화 관련 유전자들의 발현을 감소시켰다. 이상과 같은 결과는 PoA는 비알코올성 지방간염에 중요한 병인으로 작용하는 섬유화를 억제하는 작용을 함을 확인할 수 있었다. *In vivo* 연구의 결과를 종합하면 한약 제제 복령의 천연 성분인 PoA는 비알코올성 지방간염을 유발하는 데 중요하게 작용하는 중성지방의 생성, 염증 섬유화를 억제하여 비알코올성 지방간염을 억제하는 효능이 있음을 *in vivo* 실험을 통하여 확인하였다.

*In vivo*에서 PoA의 비알코올성 지방간염의 억제 효능을 세포에서 확인하였는데, Pa로 처리한 간 세포 AML12 세포에서 중성지방, 염증, 섬유화 등을 측정하였다. AML12 세포에 Pa로 처리하면 Pa에 의해 중성지방의 생성과 이와 관련된 유전자들의 발현이 증가하였으나 PoA와 함께 처리하면 Pa에 의한 중성지방의 생성과 이와 관련된 유전자들의 발현이 억제되었다. 더욱이 염증 및 섬유화 관련 유전자의 발현을 측정된 결과에서도, PoA는 Pa에 의해 증가하는 염증 및 섬유화 관련 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다.

따라서, *in vivo* 및 *in vitro* 실험의 결과를 종합하면 PoA는 중성지방 합성, 염증, 섬유화 반응을 억제함으로써 비알코올성 지방간염을 치료하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 추후 이와 같은 결과와 함께 PoA가 세포사멸 및 산화적 스트레스도 억제하는지를 분석하면 PoA의 비알코올성 지방간염의 치료 효능에 대한 분자적 기전을 더 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Chen, D. Q., Feng, Y. L., Chen, L., Liu, J. R., Wang,

- M., Vaziri, N. D. and Zhao, Y. Y. 2019. Poricoic acid A enhances melatonin inhibition of AKI-to-CKD transition by regulating Gas6/Ax1NFκB/Nrf2 axis. *Free Radic. Biol. Med.* **134**, 484-497.
2. Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M. and Sanyal, A. J. 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* **24**, 908-922.
 3. Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J. and Tveden-Nyborg, P. 2018. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 3313-3327.
 4. Kikuchi, T., Uchiyama, E., Ukiya, M., Tabata, K., Kimura, Y., Suzuki, T. and Akihisa, T. 2011. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of triterpene acids from *Poria cocos*. *J. Nat. Prod.* **74**, 137-144.
 5. Kim, J. H., Sim, H. A., Jung, D. Y., Lim, E. Y., Kim, Y. T., Kim, B. J. and Jung, M. H. 2019. *Poria cocos* wolf extract ameliorates hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism, inhibition of ER stress, and activation of autophagy via AMPK activation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4801.
 6. Li, Q., Ming, Y., Jia, H. and Wang, G. 2021. Poricoic acid A suppresses TGF-β1-induced renal fibrosis and proliferation via the PDGF-C, Smad3 and MAPK pathways. *Exp. Ther. Med.* **21**, 289.
 7. Nagappan, A., Jung, D. Y., Kim, J. H., Lee, H. and Jung, M. H. 2018. Gomisins N Alleviates ethanol-induced liver injury through ameliorating lipid metabolism and oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2601.
 8. Nie, A., Chao, Y., Zhang, X., Jia, W., Zhou, Z. and Zhu, C. 2020. Phytochemistry and pharmacological activities of *Wolfiporia cocos* (F.A. Wolf) Ryvarden & Gilb. *Front. Pharmacol.* **11**, 505249.
 9. Powell, E. E., Wong, V. W. and Rinella, M. 2021. Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet* **397**, 2212-2224.
 10. Rios, J. L. 2011. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos*. *Planta Med.* **77**, 681-691.
 11. Sheka, A. C., Adeyi O., Thompson J., Hameed, B., Crawford, P. A. and Ikramuddin, S. 2020. Nonalcoholic Steatohepatitis. *JAMA.* **323**, 1175-1183.
 12. Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M. and Feldstein, A. E. 2018. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 349-364.
 13. Schwabe, R. F., Tabas, I. and Pajvani, U. B. 2020. Mechanisms of fibrosis development in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **158**, 1913-1928.
 14. Tanaka, N., Aoyama, T., Kimura, S. and Gonzalez, F. J. 2017. Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. *Pharmacol. Ther.* **179**, 142-157.
 15. Zhang, C. and Yang, M. 2021. Current options and future directions for NAFLD and NASH treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7571.

초록 : Poricoic acid의 비알코올성 지방간염 억제 효능

김혜란 · 정대영 · 김세이 · 정명호*

(부산대학교 한의학전문대학원 한의학과)

비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)은 비알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 진행질환으로, 중성지방 침착, 염증 및 간 섬유화가 동반되어 간경변증과 간암의 원인이 되는 질환이나, 아직까지 비알코올성 지방간염을 치료하는 뚜렷한 치료제가 없는 실정이다. Poricoic acid (PoA)는 복령의 약효성분으로 여러 약리작용이 보고되었으나 비알코올성 지방간염의 치료 효능은 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 PoA가 비알코올성 지방간염의 병인에 작용하여 비알코올성 지방간염을 억제하는지를 *in vivo* 및 *in vitro* 연구를 통해 확인하였다. 비알코올성 지방간염을 유도하는 식이(high fat and methionine-choline deficient diet, HFMCDD)로 비알코올성 지방간염을 유발한 쥐에서 PoA는 HFMCDD에 의해 증가된 간 무게를 감소시켰으며, 간 독성을 나타내는 alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase도 감소시켰다. Oil Red O 염색 및 hematoxylin & eosin 염색의 결과에 의하면, PoA는 HFMCDD에 증가하는 간 조직 내 중성지방의 생성을 감소시켰으며, qPCR 결과에 의해서도 PoA는 중성 지방 합성과 관련된 유전자들의 발현도 감소시켰다. 또한 간 조직에서 CD68 면역 염색 결과에 의하면, PoA는 HFMCDD에 의해 증가하는 CD68 면역 염색을 감소시켰으며, 염증과 관련된 유전자 발현도 감소시켰다. 더욱이 sirius red 염색과 α-smooth muscle actin (α-SMA) 면역 염색으로 간 섬유화 정도를 측정된 결과, PoA는 HFMCDD에 증가되는 sirius red 염색과 α-SMA 면역 염색을 유의적으로 감소시켰으며 섬유화 관련 유전자들의 발현도 감소시켰다. 또한, PoA는 palmitate (Pa)로 처리한 간세포 AML12에서 Pa에 의해 증가하는 중성 지방산 합성, 염증 및 섬유화 관련 유전자들의 발현을 감소시켰다. 이상의 결과를 종합하면 PoA는 비알코올성 지방간염의 중요 병인인 중성지방 생성, 염증 및 섬유화를 억제하여 비알코올성 지방간염을 억제함을 확인하였다.