

산양삼(Wild-Simulated Ginseng)의 비알코올성 지방간 억제활성

박소정^{1†}, 엄유리^{2†}, 최민영¹, 정진부^{3*}

¹국립안동대학교 생약자원학과, 대학원생, ³교수, ²국립산림과학원 산림약용자원연구소, 연구사

Inhibitory Activity of Wild-Simulated Ginseng against Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in HepG-2 Cells

So Jung Park^{1†}, Yurry Um^{2†}, Min Yeong Choi¹ and Jin Boo Jeong^{3*}

¹Graduate Student and ³Professor, Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Researcher, Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Yeongju 36040, Korea

Abstract - In this study, we investigated *in vitro* inhibitory activity of wild-simulated ginseng (WSG) against non-alcoholic fatty liver disease using HepG-2 cells. T0901317 treatment increased the lipid accumulation in HepG-2 cells, but WSG treatment inhibited T0901317-mediated lipid accumulation. In addition, WSG downregulated T0901317-mediated expression of SREBP-1c, ACC, FAS and SCD-1 protein. In addition, WSG increased the phosphorylation level of LKB1 and AMPK. Compound C treatment blocked WSG-mediated downregulation of SREBP-1c protein. In conclusion, WSG is considered to inhibit the accumulation of lipids and triglycerides in HepG-2 cells by inducing the activation of LKB1 and AMPK successively, thereby reducing the expression of FAS, ACC, and SCD-1 through suppression of SREBP-1c expression.

Key words - Fatty liver disease, Non-alcoholic fatty liver disease, Wild-simulated ginseng

서 언

비알코올성 지방간(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 가장 흔한 만성 간질환으로 비만, 당뇨병 등 대사증후군과 함께 그 유병률이 급격히 증가하고 있다(Goyal *et al.*, 2020). 전 세계적으로 NAFLD의 유병률은 인구의 25%로 추정되고 있으며, 우리나라에서도 NAFLD의 발병률이 꾸준히 증가하여 성인의 유병률은 30.3%로 추정되고 있다(Im *et al.*, 2021; Younossi *et al.*, 2018; Younossi, 2019).

NAFLD는 단순 간 지방증에서 비알코올성 지방간염에 이르는 질병 스펙트럼을 나타내는 간질환으로 간의 비정상적인 지질축적을 특징으로 한다. 간의 비정상적인 지질축적은 지방산 흡수 증가, 지방 생성 증가 또는 지방산 산화 감소로 기인된다고 알려져 있다(Clark, 2006; Koo, 2013). 또한 비만은 인슐린 저

항성을 야기하여 간에 지질축적을 유발하여 NAFLD의 진행을 촉진시킨다(Brownin *et al.*, 2004; Koo, 2013). NAFLD의 지속에 의해 유발되는 간 염증은 만성 간염, 간 섬유화, 간경변으로 발전하고 결국 간암으로 진행된다(Koo, 2013). 그리하여 많은 연구자들이 NAFLD 치료제를 개발하려고 시도하였으나 아직까지 승인된 치료제는 없는 실정이다(Pydyn *et al.*, 2020). 비록 NAFLD의 치료를 위해 인슐린 감작제인 티아졸리딘디온 및 메트포르민과 같은 항당뇨제, 셀레늄 및 비타민 C와 같은 항산화제, 아토르바스타틴과 같은 지질강하제, 우르소데옥시콜산과 같은 간보호제를 사용하고 있으나, 그들의 부작용으로 인해 장기적 사용이 불가능한 실정이다(Dujic *et al.*, 2016; Pydyn *et al.*, 2020; Takahashi *et al.*, 2015). 그리하여 부작용이 없는 NAFLD의 치료제 개발을 위해 천연자원에 대한 관심이 높아지고 있다(Bacanli *et al.*, 2019).

산양삼은 사포닌계 물질인 ginsenosides와 그 외에 poly-acetylenes, phenolics, acidic polysaccharides, peptides, alkaloid, amino acids 유도체(Kim *et al.*, 1987; Park, 1996) 등

*교신저자: E-mail jjb0403@anu.ac.kr

Tel. +82-54-820-7757

† These authors contributed equally to this work.

의 유효성분을 포함하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 산양삼 효능은 항산화(Kang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017), 항암(Kim *et al.*, 2004), 혈중지질개선, 혈당강하, 항당뇨(Kim *et al.*, 2012), 항염증(Lee *et al.*, 2017), 면역 증진(Jung *et al.*, 2019; Kwon and Chung, 2004), 간 보호(Lee *et al.*, 2008) 등이 있는 것으로 알려져 있으며 재배삼에 비해 약리 효능 및 ginsenosides 함량이 높은 것으로 보고되어 효능 또한 뛰어난을 인정받고 있다(Kim *et al.*, 2020). 본 연구에서는 산양삼의 비알코올성 지방간에 대한 억제활성을 평가하기 위해 산양삼의 LXR agonist에 의한 과도한 지질축적 억제와 그 작용기전을 구명하였다.

재료 및 방법

실험재료

세포배양에 필요한 배지인 DMEM/F-12는 Lonza (Morristown, NJ, USA)에서 구매하였다. 지질축적유도와 지질축적도 확인을 위해 사용된 LXR agonist인 T09013170과 Oil Red O staining solution은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Western blot을 위한 분석용 일/이차 항체들은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구매하였다.

추출물 제조

연구에 사용된 시료는 산양삼은 경북 영주시 풍기읍에 위치한 국립산림과학원 산림약용자원연구소에서 제공받았다. 동결 건조 후 분쇄된 산양삼(WSG, 7년근) 1g을 20 mL 증류수에 침지하여 40°C의 water bath에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물은 15,000 rpm에서 20분간 원심분리를 진행하였으며 상등액만을 동결건조하여 산양삼 추출물(WSG)을 제조하였다. WSG(획득수율: 16.8%)는 -80°C의 냉동고에 보관하며 연구를 위한 시료로 사용되었다.

세포배양

본 연구에 사용된 인간 간세포인 HepG-2 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. HepG-2 세포는 10% Fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin이 함유된 DMEM/F-12 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양되었다.

Oil red O 염색

HepG-2 세포를 6-well plate에 분주한 후 24시간 배양하였

다. 24시간 후 WSG를 2시간 동안 전처리 후 LXR agonist인 T09013170을 처리하고 48시간 배양하였다. 48시간 후 HepG-2 세포를 1 × phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척 하였다. 실온에서 10% formalin으로 1시간 동안 고정한 후, 증류수로 2회 세척하여 건조한 뒤, 60% isopropanol을 사용하여 5분간 실온에 두었다. 5분 후, HepG-2 세포를 완전히 건조한 다음, 실온에서 60% isopropanol : 40% water 비율로 제조한 Oil Red O 용액을 사용하여 세포를 20분간 염색하였다. 염색 후, 증류수로 5회 세척한 뒤, HepG-2 세포에 염색된 지질 방울을 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영하였다. 촬영 후, 염색된 지질 방울은 100% isopropanol을 사용해 용출시켜 96-well에 100 µL씩 분주하여 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTT assay

WSG의 HepG-2세포에 대한 세포 생존율은 MTT assay로 측정하였다(Seo and Jeong, 2020). HepG-2세포를 96-well plate에 배양하여 세포가 well에 90% 이상 찼을 때, WSG를 농도별 처리하고 24시간 동안 배양시켰다. 24시간 후, 각 well에 MTT 용액(1 mg/mL)을 50 µL씩 첨가하고 4시간 반응시킨 후, 상등액을 제거하고 DMSO를 100 µL씩 각well에 첨가하여 녹인 후 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SDS-PAGE 및 Western blot 분석

세포로부터 단백질을 추출하기 위해, 처리 후 세포를 4°C에서 유지된 1 × phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)이 포함된 radioimmunoprecipitation buffer (Boston Bio Products, Ashland, MA, USA)를 4°C에서 30분간 처리하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)로 정량분석 후, 동일량의 단백질을 10% SDS-acrylamide gel로 전기영동하고 PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 이동시킨 후 5% non-fat dry milk로 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1시간 후, 1차 항체를 5% non-fat dry milk에 용해시켜 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 membrane을 0.05% tween-20이 포함

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene Name	Sequence
ACC	<ul style="list-style-type: none"> • Forward 5'-GCTGCTCGGATCACTAGTGAA-3' • Reverse 5'-TTCTGCTTCAGTCTGTCCAG-3'
FAS	<ul style="list-style-type: none"> • Forward 5'-GACATCGTCCATTCGTTTGTG-3' • Reverse 5'-CGGATCACCTTCTTGAGCTCC-3'
SCD-1	<ul style="list-style-type: none"> • Forward 5'-CCTCTACTTGAAGACGACATTCGC-3' • Reverse 5'-GCAGCCGAGCTTTGTAAGAGCGGT-3'
GAPDH	<ul style="list-style-type: none"> • Forward 5'-CCATGGAGAAGGCTGGG-3' • Reverse 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'

된 tris-buffered saline (TBS-T)로 5분간 3회 세척하였다. 그 후 2차 항체는 5% non-fat dry milk에 용해시켜 membrane에 상온에서 1시간 처리하였고, TBS-T로 5분간 3회 세척 후 membrane은 ECL western blotting substrate (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, England)를 이용하여 단백질을 확인하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포에서 RNA를 추출하기 위해서 세포를 4°C에서 유지된 1 × PBS로 2회 세척한 후, RNeasy Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 1 µg의 total RNA를 Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 PCR Master Mix Kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 수행되었고, 사용된 primer는 Table 1과 같다.

통계분석

모든 결과는 3 회 반복 측정 후 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 처리간 유의성은 Student's t-test로 검증하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다(Microsoft Excel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA).

결과 및 고찰

산양삼의 HepG-2세포에서 LXRα agonist에 의해 유도되는 지질 및 중성지질 억제활성

산양삼이 간세포 내의 지질축적에 영향을 미치는지 평가하

기 위해 간세포인 HepG-2세포에 산양삼과 지질형성 유도제인 T09013170 (LXR agonist)을 처리하고 지질 방울 형성과 중성지질 함량을 Oil-Red O staining과 중성지질 정량 분석으로 측정하였다. 그 결과, T0901317만 처리된 세포에서는 지질 방울 및 중성지질의 축적이 증가하였으나 T0901317 존재 하 산양삼의 처리는 T0901317에 의해 유도되는 간세포 내 지질방울과 중성지질의 축적이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 1A). 산양삼의 지질방울과 중성지질 축적 억제가 세포독성에 기인한 것으로 확인하기 위해 산양삼이 HepG-2에 독성을 나타내는지 MITT assay로 분석한 결과, 산양삼은 활성범위에서 HepG-2세포에 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1B). 본 결과를 미루어 볼 때, 산양삼은 간세포 내 과도한 지질방울 형성 및 중성지질의 축적을 억제하고 이것은 산양삼은 비알코올성 지방간을 억제하는 것을 보여준다.

산양삼의 HepG-2세포에서 LXRα agonist에 의해 유도되는 지질형성 관련 인자 발현 억제활성

Liver X receptor (LXR)인 LXRα 및 LXRβ는 nuclear receptor family에 속하는 리간드 활성화 전사 인자로 콜레스테롤 및 지질 대사의 주요 조절자로 알려져 있다(Steffensen and Gustafsson, 2004). 간에서 LXR 활성화는 sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS) 및 stearyl-coenzyme A desaturase 1 (SCD-1)과 같은 인자의 발현을 유도하여 지질 생성을 촉진한다고 보고되고 있다(Liu *et al.*, 2012). LXR 중 LXRα는 간의 중성지질 축적을 촉진하며, LXRα의 활성화 억제는 비알코올성 지방간을 치료하고 예방하는 주요한 표적인자로 여겨지고 있다(Liu *et al.*, 2012). 그리하여 산양삼이 LXRα 활성화제(T0901317)에 의해 유도되는 SREBP-1c의 발현을

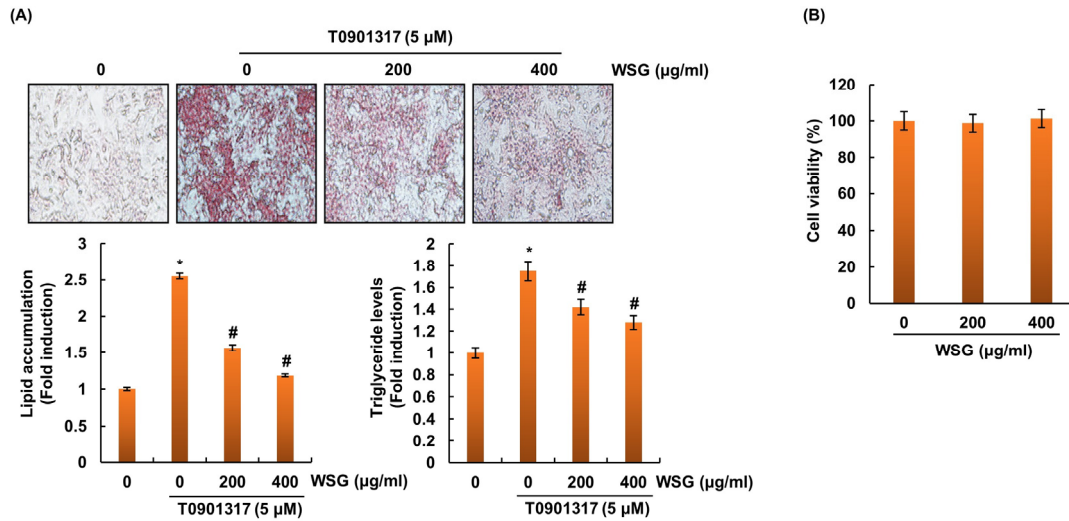


Fig. 1. Effect of WSG on lipid accumulation in HepG2 cells. (A) Representative images of oil red O stained HepG2 cells. HepG2 cells were pretreated with WSG for 2 h and then with T0901317 (5 μM) for 48 h. The effect of WSG on lipid droplet formation was determined by assessing oil red O staining. Magnification 100×. Intracellular triglyceride contents were measured using a triglyceride assay kit. Graphs are presented as the means ± SDs of triplicate experiments. *p < 0.001 versus vehicle-treated controls; #p < 0.001 versus T0901317. (B) WSG was treated with HepG-2 cells for 24 h. Cell viability was performed using MTT assay.

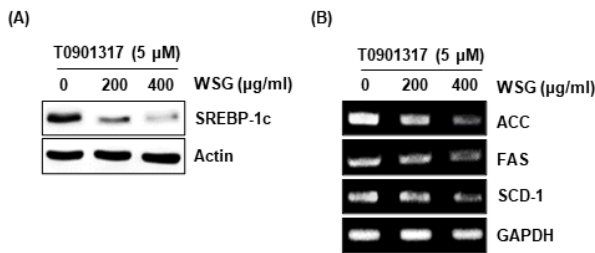


Fig. 2. Effect of WSG on the expression of SREBP-1c, ACC, FAS and SCD-1 in HepG2 cells. HepG2 cells were pretreated with WSG for 2 h and then with T0901317 (5 μM) for 48 h. (A) SREBP-1c protein level was analyzed using Western blot analysis. (B) The protein levels of ACC, FAS and SCD-1 were analyzed using RT-PCR.

억제하는지 검증하였다. 그 결과 산양삼 추출물은 LXRα 활성제 (T0901317)의 의해 유도되는 SREBP-1c의 발현을 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 2A). 또한 SREBP-1c는 지질형성을 유도하는 ACC, FAS 및 SCD-1와 같은 인자의 발현을 유도한다고 알려져 있다(Liu *et al.*, 2012). 그리하여 산양삼이 LXRα 활성제(T0901317)에 의해 유도되는 ACC, FAS 및 SCD-1의 발현을 억제하는지 검증한 결과, 산양삼은 LXRα 활성제(T0901317)에 의해 유도되는 ACC, FAS 및 SCD-1의 발현을 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 2B). 본 결과를 미루어 볼 때, 산양삼은 LXRα 활성제

(T0901317)에 의해 유도되는 SREBP-1c의 발현을 억제하여 지질형성과 관련된 ACC, FAS 및 SCD-1의 발현을 억제하여 간세포 내 지질형성을 억제하는 것으로 판단된다.

산양삼의 AMPK 신호전달 활성화 유도 활성

AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화는 간의 지방산 산화를 촉진하고 간 내 지질 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Bartlett and Eaton, 2004). 간 지질축적에 대한 산양삼의 억제활성과 관련된 분자적 메커니즘을 조사하기 위해 산양삼이 처리된 HepG-2세포에서 AMPK와 AMPK upstream kinase인 LKB1의 활성형인 인산화를 분석하였다. 그 결과, 산양삼은 농도의존적으로 LKB1과 AMPK의 인산화를 촉진시키는 것으로 나타났다(Fig. 3A).

또한 산양삼의 AMPK 활성화가 SREBP-1c의 발현억제에 미치는 영향을 조사하기 위해, AMPK 억제제인 Compound C (CC)를 활용하여 분석한 결과, CC처리가 처리되지 않은 HepG-2에서는 산양삼에 의해 SREBP-1c의 발현이 감소되었으나, CC를 통해 AMPK를 억제하였을 때 산양삼에 의한 SREBP-1c의 발현 감소가 억제되었다(Fig. 3B). 본 결과를 미루어 볼 때, 산양삼은 AMPK의 활성화를 유도하여 간세포 내 지질축적을 억제하는 것으로 판단된다.

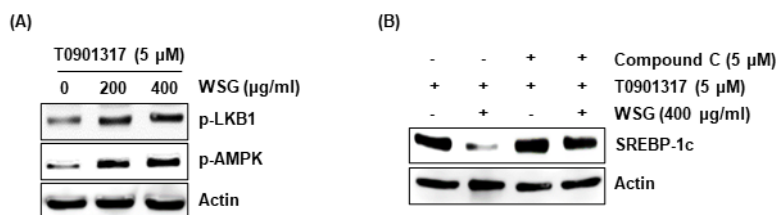


Fig. 3. Effect of WSG on AMPK signaling pathway in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were pretreated with WSG for 2 h and then with T0901317 (5 µM) for 48 h. The protein level was analyzed using Western blot analysis. (B) HepG2 cells were pretreated with WSG and Compound C for 2 h and then with T0901317 (5 µM) for 48 h. The protein level was analyzed using Western blot analysis.

적 요

간세포 내 LXR α 활성화는 전사조절인자인 SREBP-1c의 발현을 증가시키고, 발현된 SREBP-1c는 핵내로 이동하여 지질형성 관련 유전자인 FAS, ACC, SCD-1 등의 프로모토에 결합하여 FAS, ACC, SCD-1을 유도하여 중성지질의 합성을 활성화시켜 비알코올성 지방간을 초래한다. 그러나 산양삼은 LKB1 그리고 연속적으로 AMPK의 활성화를 유도하여 SREBP-1c의 발현 억제를 통해 FAS, ACC, SCD-1의 발현을 감소시켜 간세포 내 지질 및 중성지질의 축적을 억제하는 것으로 판단된다. 본 결과를 미루어 볼 때, 산양삼은 비알코올성 지방간을 예방하기 위한 건강기능성 식품소재로 개발로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

This work was supported by the research project of National Institute of Forest Science (NIFoS) [grant number: FP0802-2022-03] and by R&D Program for Forest Science Technology [Project No. 2021377C10-2123-BD02] provided by Korea Forest Service (Korea Forestry Promotion Institute),

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Bacanli, M., S.A. Dilsiz, N. Basaran and A.A. Basaran. 2019. Effects of phytochemicals against diabetes. *Adv. Food Nutr. Res.* 89:209-238.
 Bartlett, K. and S. Eaton. 2004. Mitochondrial beta-oxidation.

Eur. J. Biochem. 271:462-469.
 Clark, J.M. 2006. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J. Clin. Gastroenterol.* 40(1):S5-S10.
 Dujic, T., A. Causevic, T. Bego, M. Malenica, Z. Velija-Asimi, E.R. Pearson and S. Semiz. 2016. Organic cation transporter 1 variants and gastrointestinal side effects of metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 33:511-514.
 Goyal, A., H. Arora and S. Arora. 2020. Prevalence of fatty liver in metabolic syndrome. *J. Family Med. Prim. Care* 9: 3246-3250.
 Im, H.J., Y.C. Ahn, J.H. Wang, M.M. Lee and C.G. Son. 2021. Systematic review on the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in South Korea. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 45(4):101526.
 Jung, J.I., J.M. Kim, H.S. Kim, H.S. Kim and E.J. Kim. 2019. Immunostimulatory effect of wild-cultivated ginseng extract via the increase in phagocytosis and cytokine secretions in RAW 264.7 macrophages. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48:686-691.
 Kang, K.M., J.Y. Lee, M.U. Kim and S.H. Lee. 2016. Effect of quality characteristics and antioxidant activity of Korean cultivated wild ginseng extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45:1740-1746.
 Kim, E.L., C.S. Kim, H.Y. Lee, H.R. Lee, E.Y. Kim, M.C. Yoon and S.S. Shin. 2012. Mountain cultivated ginseng water boiled extract decreases blood glucose level and improves lipid metabolism in male db/db mice. *Korea J. Herb* 27:69-75.
 Kim, K., Y. Um, H.J. Eo, H.W. Park, K.S. Jeon and H.J. Kim. 2020. Study on the correlation between the ginsenoside contents and growth characteristics of wild-simulated ginseng with different year-roots (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Korean J. Plant Res.* 33(4):255-262.
 Kim, M.W., S.R. Ko, K.J. Choi and S.C. Kim. 1987. Distribution of saponin in various sections of *Panax ginseng* root and

- changes of its contents according to root age. Korean J. Ginseng Sci. 19:10-16.
- Kim, S.J., S.S. Shin, B.I. Seo and S.Y. Jee. 2004. Effect of mountain grown ginseng radix, mountain cultivated ginseng radix, and cultivated ginseng radix on apoptosis of HL-60 cells. Korea J. Herb 19:41.
- Koo, S.H. 2013. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. Clin. Mol. Hepatol. 19:210-215.
- Kwon, S.J. and D.K. Chung. 2004. The immune-enhancing effect of mountain gown ginseng, mountain cultivated ginseng, and *Panax ginseng*. J. Oriental Neuropsychiatry 15:89-101.
- Lee, G., G.H. Na, W.K. Kim, M.Y. Baik, H.J. Lee and J.K. Hwang. 2017. Antiinflammatory effect of cultivated wild *Panax ginseng* extracts at various ages in RAW 264.6 macrophages. Food Eng. Prog. 21:201-207.
- Lee, G., G.S. Choi, J.Y. Lee, S.J. Yun, W.K. Kim, H.J. Lee, M.Y. Baik and J.K. Hwang. 2017. Proximate analysis and anti-oxidant activity of cultivated wild *Panax ginseng*. Food Eng. Prog. 21:208-214.
- Lee, S.M., S.Y. Park, G.S. Jang and S.Y. Ly. 2008. The protective effects of ethanol extract of wild-simulated ginseng on carbon tetrachloride induced acute hepatic injury in mouse. Korean J. Nutr. 41(8):701-710.
- Liu, Y., D.K. Qiu and X. Ma. 2012. Liver X receptors bridge hepatic lipid metabolism and inflammation. J. Dig. Dis. 13: 69-74.
- Park, J.D. 1996. Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A Meyer). Korean J. Ginseng Sci. 20:389-415.
- Pydyn, N., K. Miekus, J. Jura and J. Kotlinowski. 2020. New therapeutic strategies in nonalcoholic fatty liver disease: a focus on promising drugs for nonalcoholic steatohepatitis. Pharmacol. Rep. 72:1-12.
- Steffensen, K.R. and J.A. Gustafsson. 2004. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). Diabetes 53(1):S36-S42.
- Takahashi, Y., K. Sugimoto, H. Inui and T. Fukusato. 2015. Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. World J. Gastroenterol. 21(13):3777-3785.
- Younossi, Z., Q.M. Anstee, M. Marietti, T. Hardy, L. Henry, M. Eslam, J. George and E. Bugianesi. 2018. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 15:11-20.
- Younossi, Z.M. 2019. Non-alcoholic fatty liver disease - a global public health perspective. J. Hepatol. 70:531-544.

(Received 1 November 2022 ; Revised 15 December 2022 ; Accepted 2 January 2023)