

고지방식이 유도 비알콜성지방간 마우스 모델에서 六神麴의 脂肪肝 개선효과

노종성^{1#}, 이혜림¹, 안예지¹, 윤미정², 신순식^{1*}

1 : 동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소, 2 : 목원대학교 바이오건강학부

Massa Medicata Fermentata improves fatty liver in high fat diet-fed nonalcoholic fatty liver disease' s mouse model

Jong Seong Roh^{1#}, Hye Rim Lee¹, Ye Ji Ahn¹, Mi Chung Yoon², Soon Shik Shin^{1*}

1 : Department of Formula Sciences and Research Institute of Korean Medicine for Diabetes and Obesity, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

2 : Department of Life Sciences, Mokwon University

ABSTRACT

Objectives : This study was undertaken to verify the effects of Massa Medicata Fermentata (MMF) on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) using high fat diet-fed male mice.

Methods : Fifty four male C57BL/6N mice (age matched) were used for all experiments. Nine standard chow diet-fed mice were used as normal group and forty five high fat diet-fed obese mice were randomly divided into 5 groups: control, atorvastatin-10mg/kg, MMF(1)-62.5mg/kg, MMF(2)-125mg/kg and MMF(3)-250mg/kg. After all groups were treated with several kinds of diets for 8 weeks, we measured body weight gain, adipose tissue weights, plasma lipid and glucose metabolism, visceral organ weights, histological analysis for liver on the mice.

Results : MMF-treated mice had lower body weight gain compared with controls. Among MMF-treated mice, the effect was magnified in MMF(2). MMF(3)-treated mice had lower blood plasma total cholesterol (TC) and glucose level compared with controls. MMF decreased hepatic lipid accumulation, liver fibrosis and liver inflammation of mice compared with controls. The effects was maximized in MMF(2) and atorvastatin. Blood plasma aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyltransferase (γ -GT) concentrations tends to be decreased by MMF compared with controls. Blood plasma AST, ALT, γ -GT concentrations and organ weights were not changed by MMF, indicating that all three kinds of MMF do not show any hepatotoxicity.

Conclusions : These results suggest that MMF improves NAFLD by reducing body weight gain, hepatic lipid accumulation, liver fibrosis, liver inflammation.

Key words : Massa Medicata Fermentata, NAFLD, liver fibrosis, total cholesterol

서론

비알콜성 지방간질환 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 간세포의 지방축적이 관찰되나 염증이나 섬유화가 거의 없는 단순지방증과 염증 및 섬유화 소견을 보이는 비알

콜성 지방간염 (steatohepatitis, NASH)으로 나눌 수 있다¹⁾. 비알콜성 지방간은 비만과 매우 밀접한 관계를 지니며²⁾, 간경변증이나 간세포암 같은 진행성 간질환으로 발전될 수 있고³⁾, 최근 당뇨, 심혈관계질환 및 신장질환 등에 독립적인 위험인자로 보고되고 있다¹⁾. 또한 우리나라 비알콜성 지방간의 유병

*교신저자 : 신순식, 부산 부산진구 양정로 52-57 동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소
· Tel : 051-850-7414 · E-mail : ssshin@deu.ac.kr
#제1저자 : 노종성, 부산 부산진구 양정로 52-57 동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소
· Tel : 051-850-8647 · E-mail : jsjs101@deu.ac.kr
· 접수 : 2014년 2월 12일 · 수정 : 2014년 3월 10일 · 채택 : 2014년 3월 19일

율이 2004년 11.5%에서 2010년 23.6%로 6년새 2배 정도 급격히 증가한 것으로 나타나⁴⁾ 비알콜성 지방간 치료에 대한 중요성이 점점 커지고 있다.

육신국 (Massa Medicata Fermentata, MMF)은 神麴 또는 六曲이라고도 불리며, 밀가루와 밀기울, 赤小豆末, 杏仁泥, 靑蒿汁, 蒼耳汁, 野蓼汁 등의 재료를 반죽하여 누룩과 같이 만들어 짚이나 마대 또는 삼잎으로 싸서 온실에서 발효한 것으로 消食藥에 속한다⁵⁾. 그 성은 溫하며, 味는 辛甘하고, 歸經은 脾胃經이다. 行氣消食, 健脾開胃의 효능을 지녀 食積不消, 脘腹脹滿, 不思飲食, 脾虛食滯, 腹鳴腹瀉 등을 치료한다⁶⁾. 육신국이 配伍藥物로 들어간 감비경신환(3) (GGH(3))이 체중감량 효과 및 지방간의 개선 효과를 지닌 것으로 밝혀졌으며⁷⁾, 밀순 추출물이 고지혈증 및 간조직 지질 침착을 개선하는 효과가 있는 것으로 보고되었다⁸⁾. 따라서 육신국 단미만 사용할 경우에도 체중감량과 지방간 개선 효과가 있는지 검증하고자 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 고지방식이 수컷 마우스 비알콜성지방간 모델을 이용하여 육신국의 투여가 체중증가량, 식이효율, 혈중 간장내 지질대사 조절 지표와 독성지표, 지방조직의 무게 변화, 간조직의 형태학적 분석을 통해, 지방간 개선에 어떤 영향을 주는 지에 대해서 조사하였다

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

공시동물로서는 싹타코 (경기, 한국)에서 공급한 7주령의 C57BL/6N 수컷 마우스 54마리를 사용하였다. 1주간 안정화 과정을 거친 후, 정상군 9마리와 고지방식이군 45마리를 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 하여 고지방식이군에게 8주간 45kcal%의 고지방식이를 투여하여 비알콜성지방간을 유발하였다. 그 후 고지방식이군을 다시 체중범위에 따른 무작위법에 의하여 control, MMF(1), MMF(2), MMF(3)과 atorvastatin군으로 각각 9마리씩 분리하여 이를 실험에 사용하였다.

사육환경은 온도 21 ± 3 °C, 습도 55 ± 5 %, 환기 횟수 15~17 회/hour, 조도 150~300 lux, 조명은 12시간 명암 (점등: 6:00, 소등: 18:00)으로 조정하여 실험 기간동안 일정하게 SPF (specific pathogen free) 상태로 유지하였다. 고품사료 (Harlan, USA)와 물은 자유 급이와 급수를 시켰다.

2) 실험물질

실험물질은 육신국을 사용하였다. 육신국은 『東醫寶鑑』 「雜病篇」의 「造神麴法」에 따라⁹⁾ 국산 小麥, 赤小豆, 杏仁, 蒼耳莖葉汁, 靑蒿莖葉汁과 野蓼莖葉汁의 여섯 종을 혼합하고 100일간 자연 발효한 뒤 200mesh로 분쇄하여 사용하였다 (Table 1). 대조군은 멸균수를 사용하였고, 양성대조군으로 비알콜성 지방간 치료에 사용되는¹⁰⁾ 고지혈증 치료제 atorvastatin (Pfizer, Ireland)을 사용하였다.

Table 1. The composition of MMF

	Name	Ingredient	Weight
六神麴 (MMF)	小麥	Triticum aestivum L.	25斤
	赤小豆	Phaseolus angularis	1升
	杏仁	Prunus sibirica L.	1升3合
	蒼耳	Xanthium strumarium L.	1升
	靑蒿	Artemisia apiacea Hance	1升3合
	野蓼	Anemarrhena asphodeloides	1升

3) 실험군 및 투여방법

군당 9마리 수컷을 공시하였으며, 정상군은 10kcal% 일반식이를, 실험군과 대조군은 45kcal% 고지방식이를 공급하였다. 실험약물로 대조군은 멸균수를, MMF는 62.5, 125와 250mg/kg의 용량을, atorvastatin은 10mg/kg의 용량으로 8주간 경구투여 하였다(Table 2).

Table 2. Experimental groups

Group	Treatment	Number	Sex
Normal	Low fat(10kcal%)	9	male
	High fat(45kcal%) + MMF(mg/kg BW)		
Control	water	9	male
MMF(1)	62.5	9	male
MMF(2)	125	9	male
MMF(3)	250	9	male
Atorvastatin	High fat(45kcal%) + Atorvastatin(mg/kg BW)	9	male
	10		

2. 연구방법

1) 체중 증가량 측정

MMF(1), MMF(2), MMF(3)과 atorvastatin이 체중증가량에는 어떤 변화를 주는지 알아보기 위하여 매주 2회 8주 동안 체중을 측정하고, 이를 근거로 하여 체중증가량을 계산하였다.

2) 혈액생화학 분석

혈액 채취는 실험시작 8주 후 12시간 절식한 뒤 diethyl ether로 마취한 다음 개복하여 복대정맥에서 혈액 1ml를 채취하였으며, 고속원심분리기 (Micro 12, Hanil, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 분리된 혈장은 냉동고 (-20°C)에 보관하고 혈액생화학분석기 (Selectra 2, Vitalab, Netherlands)를 사용하여 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyltransferase (γ -GT), high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), free fatty acid (FFA), glucose와 insulin의 혈중 농도를 각각 측정하였다.

3) 동물부검

체혈한 뒤 부검하여 지방조직, 간장, 심장, 비장, 신장과 췌장의 무게를 측정하고, 이들의 크기와 색깔을 육안적으로 관찰하였다.

4) 조직의 형태학적 분석

(1) 간의 지방축적 분석

마우스에서 분리한 간조직을 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 이상 고정하고 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 60% ethanol, 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol, 100% ethanol에서 각각 1시간씩 탈수시켰다. Xylen에 1시간씩 3번의 투명과정 후 paraffin에 1시간 씩 2번 침투과정을 실시하였다. 포매과정을 거쳐 약 3 μ m의 두께로 박절하여 slide 위에 조직을 얹고 건조시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. Slide의 물기를 없애고 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다.

(2) 간의 비만세포 분석

마우스에서 분리한 간조직을 약 5 μ m로 자른 절편을 부착시킨 슬라이드를 담은 트레이를 증류수에 5분간 담아두었다. 그리고 toluidine blue working solution에 3분간 담아두었다. 그 후 증류수, 95% ethanol과 100% ethanol에 각각 차례대로 3회 담갔다 꺼내는 것을 반복하였다. Ethanol 단계는 조직에서 염색이 빠질 수 있기에 빠르게 실시하였다. 그리고 paraffin 제거를 위해 xylene에 3분간 2회 담아둔 후 상온에서 조직을 말리고 canada balsam (3) : xylene (1)의 비율로 제작한 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다.

(3) 간의 collagen 축적 분석

마우스에서 분리한 간조직을 약 5 μ m로 자른 절편을 부착시킨 슬라이드를 담은 트레이를 100% 에탄올 3분, 95% 에탄올 3분, 70% 에탄올에 3분 동안 차례대로 담근 후 증류수로 5 6 $^{\circ}$ C 중탕시킨 bouin's solution에 5분 동안 담아두었다. 그 후 흐르는 물에 2시간 동안 bouin's solution이 없어질 때까지 씻어냈다. Weigert's iron hematoxylin working solution에 10분간 담아둔 후 흐르는 물에 10분간 용액을 씻어내고 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하고, biebrich scarlet acid fuchsin solution에 15분간 담아둔 후 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하였다. 그리고 phosphotungstic solution에 15분간 담아둔 후, aniline blue solution에 10분간 담고 증류수에 3회 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 1% acetic acid solution에 5분간 담아두었다. 95% ethanol과 100% ethanol에 3회씩 차례대로 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 paraffin 제거를 위해 xylene에 3분간 2회 담아두었다. 상온에 조직을 말린 후 canada balsam (3) : xylene (1)의 비율로 제작한 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다.

모든 조직의 사진촬영과 지방조직, 비만세포와 collagen의 수 및 크기분석은 image analysis system (Image Pro-Plus, MD, USA)을 이용하였다.

3. 통계분석

모든 값은 mean \pm standard deviation(SD)으로 표시하며, OriginLab Version 7.5(OriginLab Corporation, MA, USA)의 ANOVA one way를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 체중 증가량과 지방무게

MMF(1)은 대조군에 비하여 8일째부터 통계적으로 유의하게 체중 증가량이 감소하였으며(p<0.01), 11일째가 되어 감소폭이 약간 감소하였다(p<0.05) 15일째부터 다시 감소폭이 늘었고(p<0.01), 18일째부터 다시 감소폭이 줄어들었다(p<0.05). 22일째부터 25일째까지는 체중 증가량에 대한 통계적 유의성이 없다가, 29일째부터 다시 감소하기 시작하여(p<0.01), 마지막 날인 57일째까지 감소폭의 변화는 있지만 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하였다. MMF(2)는 8일째부터 체중증가량이 현저히 감소하였으며(p<0.001), 18일째까지 지속적으로 감소하였다(p<0.01), 18일째부터 22일째까지는 감소량이 둔화되어 통계적 유의성이 없었으며, 25일째부터 다시 감소하기 시작하여(p<0.05), 29일째부터 마지막 날까지 현저한 감소를 보였다(p<0.001). MMF(3)는 4일째부터 현저한 감소를 보이다가(p<0.001), 11일째부터 약간 둔화되었다(p<0.01), 18일째부터 25일째까지 체중증가량 감소에 통계적 유의성이 없다가, 29일째부터 다시 감소하기 시작하였다(p<0.01). 50일째부터 감소폭이 약간 줄었으며(p<0.05), 마지막 날인 57일째 감소폭이 다시 늘어났다(p<0.01). Atorvastatin 군은 4일째부터 지속적인 감소를 유지하다가(p<0.05), 22일째 주춤하였으며, 25일째부터 다시 통계적으로 유의하게 감소하기 시작하였으며, 36일째부터 39일째까지 감소폭이 더 늘어났다가(p<0.01), 마지막 날에 다시 둔화되었다(p<0.05).

대조군에 비하여 MMF 세 농도군과 atorvastatin 군 모두 체중 감량에 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다. 감량의 정도는 atorvastatin 군에 비해 MMF 군이 더 큰 것으로 나타났으며, MMF 군의 세 농도 중 MMF(2)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Effect of MMF and atorvastatin extracts on body weight gain in high fat diet-fed obese mice

Date	Body weight gain (g)					
	Normal	Control	MMF(1)	MMF(2)	MMF(3)	Atorvastatin
4	-0.900 \pm 0.515	-0.607 \pm 0.785	-1.472 \pm 0.906	-1.513 \pm 1.205	-1.884 \pm 0.529 ^{***}	-1.581 \pm 0.641 [†]
8	-0.553 \pm 0.648	0.477 \pm 1.403	-1.822 \pm 1.333 ^{***}	-2.591 \pm 1.216 ^{***}	-2.567 \pm 1.236 ^{***}	-1.544 \pm 1.635 [†]
11	-0.409 \pm 0.852	-0.608 \pm 1.120	-2.297 \pm 1.424 [†]	-2.637 \pm 1.178 ^{***}	-2.900 \pm 1.484 ^{***}	-2.207 \pm 1.566 [†]
15	0.054 \pm 0.792	0.138 \pm 1.824	-2.571 \pm 1.422 ^{***}	-2.052 \pm 1.267 ^{***}	-2.733 \pm 1.673 ^{***}	-1.993 \pm 1.432 [†]
18	0.203 \pm 1.077	-0.884 \pm 1.767	-2.750 \pm 1.705 ^{***}	-2.263 \pm 0.977	-2.557 \pm 1.802	-2.430 \pm 1.212 [†]
22	0.149 \pm 1.462	-0.692 \pm 1.525	-1.361 \pm 1.908	-1.780 \pm 0.990	-1.753 \pm 1.575	-2.134 \pm 1.401
25	-0.173 \pm 1.213	-0.826 \pm 1.411	-1.959 \pm 1.512	-2.404 \pm 1.110 [†]	-2.219 \pm 1.592	-2.571 \pm 1.605 [†]
29	-0.071 \pm 1.246	0.766 \pm 1.512	-1.547 \pm 1.676 ^{***}	-1.942 \pm 1.175 ^{***}	-1.628 \pm 1.274 ^{***}	-0.986 \pm 1.372 [†]
32	0.109 \pm 1.609	1.273 \pm 1.551	-0.694 \pm 1.644 [†]	-1.384 \pm 1.027 ^{***}	-0.738 \pm 1.111 ^{***}	-0.621 \pm 1.502 [†]
36	0.326 \pm 1.828	2.223 \pm 1.659 [†]	0.056 \pm 1.462 [†]	-0.839 \pm 1.052 ^{***}	-0.181 \pm 1.311 ^{***}	0.008 \pm 1.395 ^{***}
39	0.757 \pm 1.676	2.922 \pm 1.877 [†]	-0.014 \pm 1.716 ^{***}	-1.110 \pm 1.396 ^{***}	0.326 \pm 1.189 ^{***}	0.660 \pm 1.268 ^{***}
43	0.921 \pm 1.773	3.634 \pm 2.080 ^{††}	0.679 \pm 1.585 ^{***}	-0.116 \pm 1.024 ^{***}	1.230 \pm 1.086 ^{***}	1.427 \pm 1.209 [†]
46	1.008 \pm 1.467	3.782 \pm 2.009 ^{††}	0.892 \pm 1.534 ^{***}	0.039 \pm 0.935 ^{***}	1.503 \pm 0.999 ^{***}	1.600 \pm 1.289 [†]
50	1.531 \pm 1.637	4.124 \pm 2.123 [†]	1.703 \pm 1.435 [†]	0.719 \pm 0.939 ^{***}	1.974 \pm 1.081 [†]	2.024 \pm 1.058 [†]
53	1.798 \pm 1.563	4.832 \pm 2.230 ^{††}	2.512 \pm 1.442 [†]	1.388 \pm 1.251 ^{***}	2.786 \pm 1.005 [†]	2.623 \pm 1.119 [†]
57	2.196 \pm 1.879	5.554 \pm 2.406 ^{††}	2.079 \pm 1.738 [†]	1.548 \pm 1.192 ^{***}	2.299 \pm 1.060 ^{***}	3.116 \pm 1.095 [†]

Data are expressed as the mean \pm SD. [†]p<0.05, ^{††}p<0.01, ^{†††}p<0.001 compared with normal. ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 compared with control.

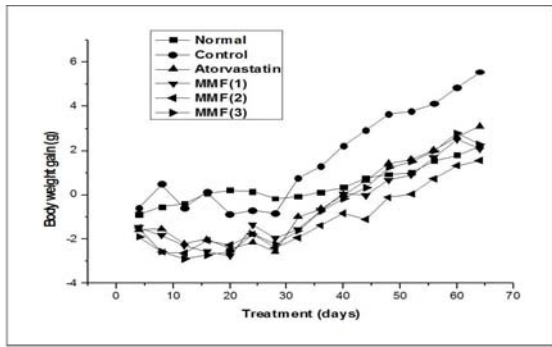


Fig. 1. Changes in body weight gain of MMF and atorvastatin against high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean \pm SD.

8주간 약물 투여 후 부검하여 장간막 지방조직 (mesenteric adipose tissue, MAT), 생식기 주변 백색지방조직 (epididymal adipose tissue, EAT), 후복벽 주변 백색지방조직 (retroperitoneal adipose tissue, RAT), 사타구니 주변 피하지방조직 (inguinal adipose tissue, IAT)과 갈색지방조직 (brown adipose tissue, BAT)의 무게를 측정하였다. MMF(2)에서 대조군에 비하여 RAT의 무게가 약간 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 2-3).

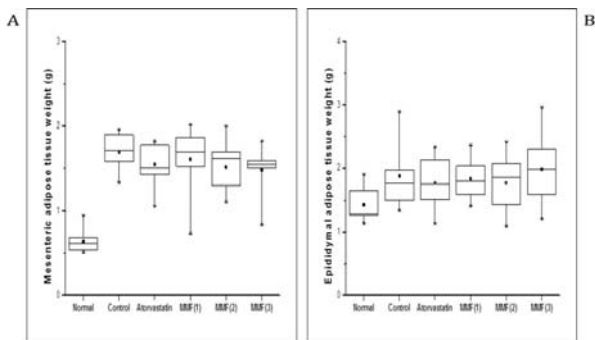


Fig. 2. Mesenteric adipose tissue(A) and epididymal adipose tissue(B) weights in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean \pm SD.

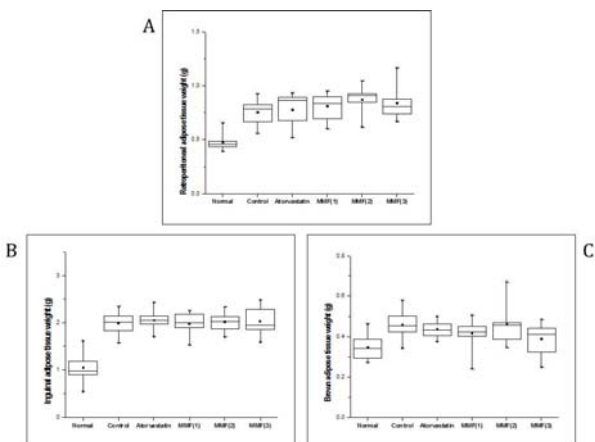


Fig. 3. Retroperitoneal adipose tissue(A), inguinal adipose tissue(B) and brown adipose tissue(C) weights in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean \pm SD.

2. 혈액생화학분석

1) 혈중 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase와 γ -glutamyltransferase 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase와 γ -glutamyltransferase의 양을 측정한 결과, atorvastatin과 MMF 세농도 모두 대조군에 비하여 통계적인 유의성은 없었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Biochemical examination of blood in high fat diet-fed obese mice

Factors	Normal	Control	MMF(1)	MMF(2)	MMF(3)	Atorvastatin
AST(U/L)	156,33 \pm 42	212,56 \pm 103,50	178,11 \pm 57,97	174,11 \pm 64,61	166,78 \pm 67,65	178 \pm 159,71
ALT(U/L)	28,89 \pm 4,60	95,22 \pm 42,97 ^{†††}	80,67 \pm 49,56	75,44 \pm 51,18	57,89 \pm 47,46	60,67 \pm 48,40
γ -GT(U/L)	0,43 \pm 0,05	0,44 \pm 0,13	0,38 \pm 0,07	0,41 \pm 0,03	0,42 \pm 0,07	0,38 \pm 0,14
HDL(mg/dl)	137,44 \pm 11,75	158,78 \pm 14,71 ^{††}	155 \pm 16,55	164 \pm 21,74	149,33 \pm 15,44	137,56 \pm 14,13 ^{**}
LDL(mg/dl)	20,67 \pm 5,81	40,11 \pm 9,49 ^{†††}	35,33 \pm 9,84	38,78 \pm 15,30	31,89 \pm 9,27	24,78 \pm 6,06 ^{***}
TC(mg/dl)	157,44 \pm 14,49	201,22 \pm 23,37 ^{†††}	188,78 \pm 26,14	203,33 \pm 39,23	176,11 \pm 21,23 [†]	160,78 \pm 17,19 ^{***}
TG(mg/dl)	78,67 \pm 13,15	90,38 \pm 17,94	84,56 \pm 11,43	88,11 \pm 11,76	77,56 \pm 5,18	72,67 \pm 13,72 [†]
FFA(μ Eq/L)	977,89 \pm 163,58	879 \pm 109,02	970,44 \pm 114,58	1011 \pm 75,69 ^{**}	977,11 \pm 89,87	868,89 \pm 96,94
Glucose(mg/dl)	177,22 \pm 20,27	213,67 \pm 44,40 [†]	201,44 \pm 32,64	204 \pm 24,79	176,67 \pm 17,32 [†]	200,56 \pm 32,17
Insulin(ng/dl)	0,81 \pm 0,47	2,23 \pm 0,87 ^{†††}	2,00 \pm 0,92	2,67 \pm 1,49	2,09 \pm 1,15	2,93 \pm 1,47

Data are expressed as the mean \pm SD. [†]p<0.05, ^{††}p<0.01, ^{†††}p<0.001 compared with normal. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with control. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γ -GT, γ -glutamyltransferase; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; FFA, free fatty acid.

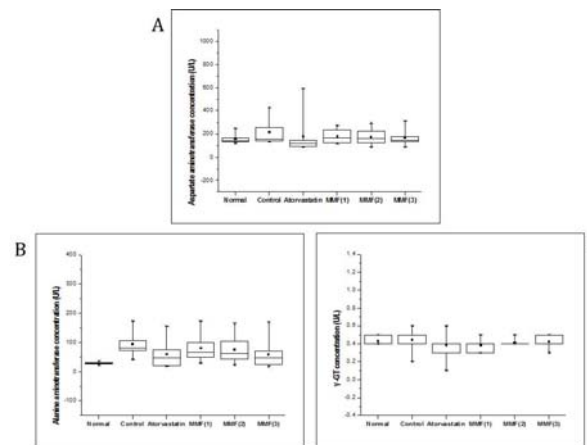


Fig. 4. Fasting plasma aspartate aminotransferase(A), alanine aminotransferase(B) and γ -glutamyltransferase(C) levels in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean \pm SD.

2) 혈중 HDL-cholesterol, LDL-cholesterol과 total cholesterol 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 HDL-cholesterol, LDL-cholesterol과 total cholesterol의 양을 측정한 결과, HDL-cholesterol의 값은 대조군에 비하여 atorvastatin이 통계적으로 유의하게 낮았으며, MMF 세농도 모두는 대조군에 비하여 통계적인 유의성은 없었다(Table 4, Fig. 5-A). LDL-cholesterol의 값은 대조군에 비하여 atorvastatin이 통계적으로 유의하게 낮았으며, MMF 세 농도 중 MMF(3)이 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4, Fig. 5-B). Total cholesterol의 값은 대조군에 비하여 atorvastatin과 MMF(3)에서 통계적으로 유의하게 낮은 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 5-C).

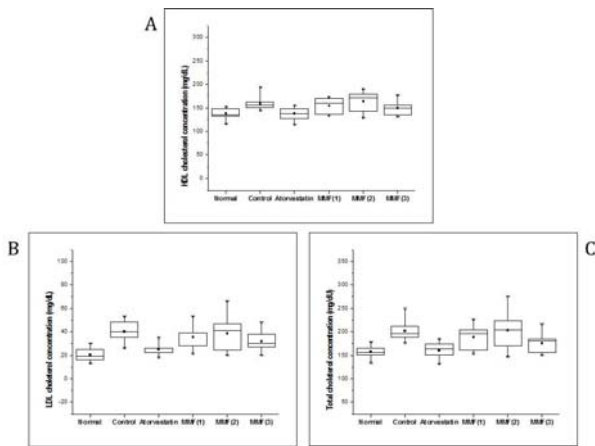


Fig. 5. Fasting plasma HDL-cholesterol(A), LDL-cholesterol(B) and total cholesterol(C) levels in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean \pm SD. HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein.

3) 혈중 triglyceride와 free fatty acid 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 triglyceride와 free fatty acid의 양을 측정한 결과, triglyceride의 값은 대조군에 비하여 atorvastatin이 통계적으로 유의하게 낮았으며, MMF(3)에서 대조군에 비하여 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 4, Fig. 6-A). Free fatty acid의 값은 대조군에 비하여 MMF(2)와 MMF(3)이 높은 것으로 나타났으며, MMF(2)에서 통계적인 유의성이 있었다(Table 4, Fig. 6-B).

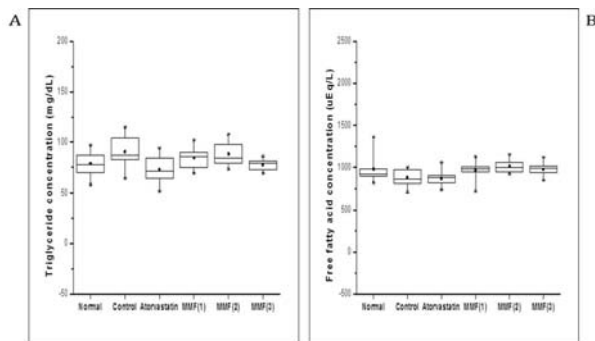


Fig. 6. Fasting plasma triglyceride(A) and free fatty acid(B) levels in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean \pm SD.

4) 혈중 glucose와 insulin 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 glucose와 insulin의 양을 측정한 결과, glucose의 값은 대조군에 비하여 atorvastatin은 통계적으로 유의한 차이는 없었으며, MMF 세농도 중 MMF(3)에서 통계적으로 유의하게 낮았다(Table 4, Fig. 7-A). Insulin의 값은 대조군에 비하여 atorvastatin과 MMF 세농도 모두는 통계적인 유의성이 없었다(Table 4, Fig. 7-B).

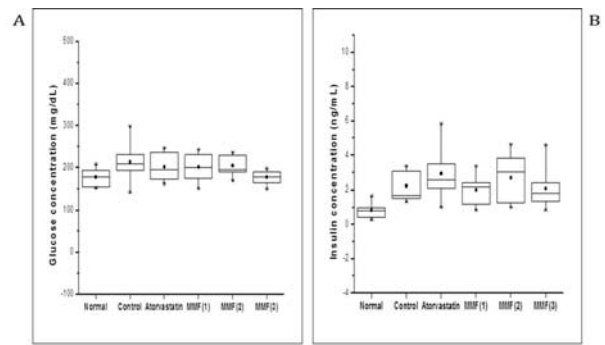


Fig. 7. Fasting plasma glucose(A) and insulin(B) levels in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean \pm SD.

3. 육신국에 의한 간조직의 histology와 morphology 변화

1) 육신국에 의한 간조직의 지방축적 변화

MMF가 고지방식이 비만모델 마우스의 간지방증에 미치는 영향을 조사하기 위하여 간조직 section을 hematoxylin & eosin으로 염색하였다. 정상군에 비하여 대조군의 간에서 지방축적이 현저하게 증가하였다. 그러나 고지방식이 마우스에 MMF를 처리하였을 때 간의 지방축적이 감소하였으며, MMF(2)에서 가장 효과적으로 감소하였다. Atorvastatin도 간의 지방축적을 억제하였으며, 효과정도는 MMF(2)와 유사하였다(Fig. 8).

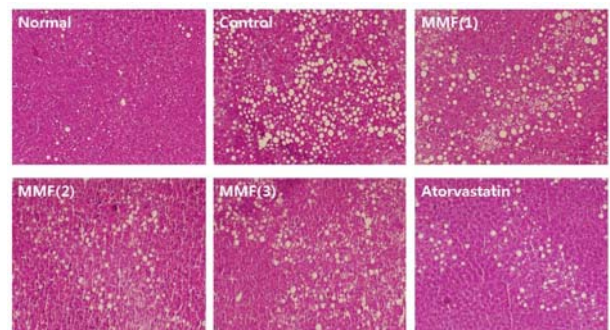


Fig. 8. Liver steatosis. Original magnification X100.

2) 육신국에 의한 간조직의 비만세포 변화

간의 염증반응을 조사하기 위하여 간조직 section을 toluidine blue로 염색한 후 간조직에 침투한 비만세포 (mast cell)를 조사하였다. 정상군에 비하여 대조군의 간에서 비만세포가 현저하게 증가하였다. 그러나 고지방식이 마우스에 MMF를 처리하였을 때 간의 비만세포는 감소하였으며, MMF(2)에서 가장 효과적으로 감소하였다. Atorvastatin도 간의 비만세포를 감소시켰으며, 효과정도는 MMF(2)와 유사하였다(Fig. 9).

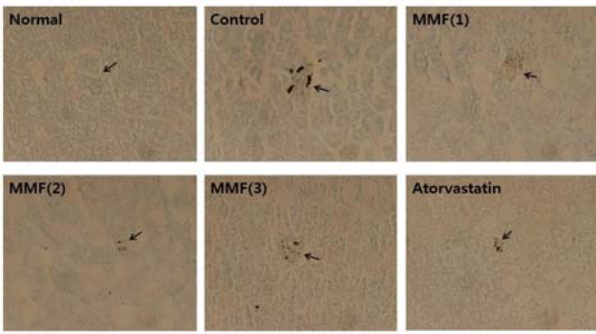


Fig. 9. Liver inflammation. Original magnification X400.

3) 육신국에 의한 간조직의 collagen 축적 변화

간의 섬유증을 조사하기 위하여 간조직 section을 Masson's trichrome으로 염색한 후 간조직의 collagen 축적을 조사하였다. 정상군에 비하여 대조군의 간에서 collagen이 증가하였다. 그러나 고지방식이 마우스에 MMF를 처리하였을 때 간의 collagen이 감소하였으며, MMF(2)에서 가장 효과적으로 감소하였다. Atorvastatin도 간의 collagen을 감소시켰으며, 효과적도는 MMF(2)와 유사하였다(Fig. 10).

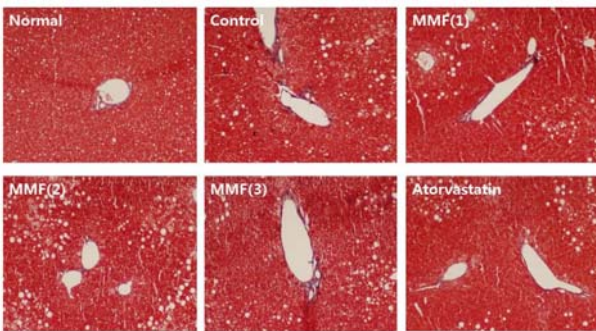


Fig. 10. Liver fibrosis. Original magnification X100.

4. 장기무게

실험종료 후 부검시 간장, 심장, 비장, 신장과 췌장의 무게를 잰 결과, MMF를 투여할 경우 간장의 무게가 줄어드는 경향이 있었으나 통계적으로 유의성은 없었다. 기타 모든 장기의 무게도 atorvastatin과 MMF 세 농도 모두에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 11-12).

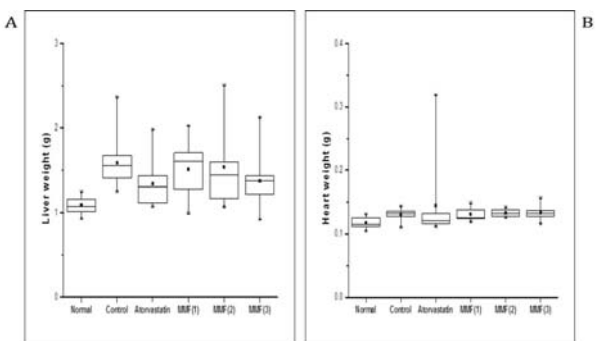


Fig. 11. Liver(A) and heart(B) weights in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean ± SD.

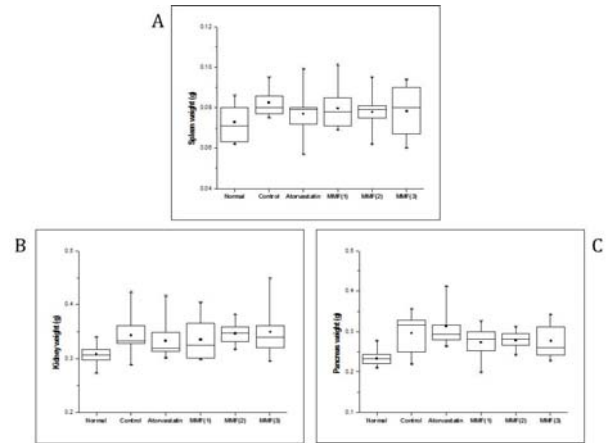


Fig. 12. Spleen(A), kidney(B) and pancreas(C) weights in high fat diet-fed obese mice. Data are expressed as the mean ± SD.

고찰

우리나라는 간질환 및 간암으로 인한 사망률이 높은 나라에 속한다¹¹⁾. 또한 최근 식생활 및 생활습관의 변화로 인해 비알콜성 지방간의 유병률이 급격하게 높아지고 있으며, 소아비만이 늘어나면서 소아에서의 비알콜성 지방간 질환 역시 늘어나는 추세이다¹²⁾. 비알콜성 지방간은 그 자체가 간경변증이나 간세포암 등 진행성 간질환으로 발전될 수 있으며^{3,13)}, 제2형 당뇨병과 전당뇨병, 고지혈증, 고혈압 등 대사증후군 발생을 증가시키며^{14,15)}, 심혈관계 질환을 증가시키는 것으로 보고되어¹⁶⁾, 지방간 치료의 중요성이 점차 커지고 있다. 현재 지방간 개선을 위하여 많은 약물이 연구개발 되었으나¹⁷⁾, 장기복용 할 경우 부작용 등이 있어 이상적인 치료약물은 없는 실정이다. 중국에서는 한약재를 이용한 NAFLD 치료 연구가 계속 진행되는 등¹⁸⁾ 한방요법을 이용하여 지방간을 개선하고자 하는 노력이 이어지고 있다.

비알콜성 지방간은 비만과 밀접한 관련이 있으며, 인슐린 저항성이 NAFLD의 가장 중요한 인자로 알려져 있다¹⁹⁾. 과체중이나 비만인 비알콜 지방간 환자에서 체중 감량을 할 경우 간내 지방량이 감소하는 것으로 보고되었다^{20,21)}. 그리고 NASH의 발병기전은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 인슐린 저항성에 의한 간내 지방축적에 산화성 스트레스가 가해져 염증이 발생하는 것으로 알려져 있다^{22,23)}.

육신국은 消食藥에 속하여 消食, 健脾의 작용이 있어 한방 비만변증 중 脾虛型, 食積型 비만²⁴⁾의 치료에 유용할 것으로 생각된다. 육신국의 구성약물 중 赤小豆는 항염증 작용 및 간소염내 지방 감소효과가 있을 것으로 알려져 있으며^{25,26)}, 杏仁, 蒼耳, 野藜는 항산화 및 항염 작용이 있는 것으로 보고되었다²⁷⁻²⁹⁾. 그리고 육신국이 들어간 감비경신환이 체중감량과 지방간의 개선에 기여하는 것으로 나타났다⁷⁾.

본 연구에서는 육신국의 투여가 체중감량 및 지방간 개선에 어떤 영향을 주는 지에 대해서 지방간염 치료제의 하나인 atorvastatin과 비교하여 조사하였다.

체중증가량은 8주간 측정된 결과 MMF 세 농도와 atorvastatin 모두 대조군에 비하여 체중 감량에 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다. 감량의 정도는 atorvastatin에 비해 MMF 세 농도가 더 큰 것으로 나타났으며, MMF 세 농도 중

MMF(2)에서 그 정도가 더 큰 것으로 나타났다.

지방무게는 MAT, EAT, RAT, IAT와 BAT의 무게를 측정하였다. 모든 지방의 무게는 MMF와 atorvastatin 모두 대조군에 비하여 비슷한 것으로 나타났다. 따라서 체중증가량이 감소한 것에 비례하여 지방무게의 감소는 통계적으로 유의하게 나타나지 않았으나, 지방간 유발과 관련된 MAT는 감소하는 경향을 보였다.

MMF 투여가 간독성과 지질대사에 어떠한 영향을 미치는지 알기 위하여 혈액검사를 시행하였다. 神麴은 『東醫寶鑑』에 無毒한 약재로 소개되어 있으며⁹⁾, 현재까지 많은 임상가에게 쓰였지만, 안전성에 관한 연구는 아직 부족한 편이다³⁰⁾. 간장독성지표인 AST, ALT와 γ -GT의 값은 생리적인 범위 안에 있었으며 MMF와 atorvastatin 모두 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 실험종료 후 부검 시 장기의 무게를 잰 결과, MMF와 atorvastatin은 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 따라서 MMF는 간독성으로부터는 안전한 것으로 판단된다. 그리고 AST와 ALT는 간세포 내에 존재하는 효소로 간섬유화나 염증 등으로 간이 손상 받았을 때 혈청 수치가 높아지게 되는데^{31,32)}, AST와 ALT의 수치는 MMF를 투여할 경우 대조군에 비하여 통계적인 유의성은 없었지만 낮아지는 경향을 보였다.

지질대사 관련 지표인 HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol, triglyceride, free fatty acid와 당대사 관련 지표인 glucose, insulin을 조사하였다. 양성 대조군인 atorvastatin은 HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol, triglyceride가 통계적으로 유의하게 감소되었다. 반면에 MMF는 대부분의 지표에서 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며, MMF(3)에서 total cholesterol과 glucose의 농도가 통계적으로 유의하게 감소하였다. 지방간은 대개 중성지방으로 축적되며, 혈중 triglyceride 수치가 지방간과의 연관성이 큰 것으로 보고되고 있다³³⁻³⁴⁾. 따라서, MMF의 투여가 혈중 체중조절 관련 지표에는 큰 영향을 미치지 않으나 total cholesterol과 glucose의 농도를 감소시키고 triglyceride의 농도를 감소시키는 경향이 있어, 지질대사와 당대사를 조절하고 지방간 개선에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

MMF가 지방간 개선에 도움을 주는지 알아보기 위하여, 고지방식이 마우스 비알콜성지방간 모델의 간세포의 조직학적, 형태학적 변화를 조사하였다.

간세포의 지방축적은 대조군에 비하여 MMF와 atorvastatin 모두 감소하였다. MMF 세 농도 중에서 MMF(2)를 투여할 경우 가장 효과적으로 감소하였으며, atorvastatin의 효과 정도는 MMF(2)와 유사하였다.

간의 염증 정도를 조사하기 위하여 간조직의 비만세포를 검사한 결과, 비만세포는 대조군에 비하여 MMF와 atorvastatin 모두 감소하였다. MMF(2)와 atorvastatin 투여시 가장 효과적으로 감소하는 것으로 나타났다.

간의 섬유증을 조사하기 위하여 간조직의 collagen 축적을 조사하였다. collagen 축적 또한 MMF와 atorvastatin이 대조군에 비하여 모두 감소하였으며, MMF(2)와 atorvastatin이 가장 효과적으로 감소하였다.

그러므로 체중감량효과와 일치하게 MMF에 의하여 간세포의 지방축적이 억제되었고, 염증 정도와 섬유증 역시 감소하

였으며, 이는 atorvastatin에 의한 효과에 비하여 MMF의 효과가 대등하다는 것을 알 수 있다.

대부분의 비알콜성 지방간은 양호한 경과를 보이며 지방간염, 간경변으로 드물게 진행하지만³⁵⁾, 고도 비만이나 제2형 당뇨병 같은 대사증후군이 동반될 경우 지방간염, 간경변증으로 악화될 수 있다³⁶⁾. 또한 비만 등 고위험군 환자에서 간손상 및 섬유화 정도가 높으면 심한 간질환으로 진행될 수 있다^{37,38)}.

따라서 MMF는 체중감량효과를 나타내고, 간조직의 지방축적을 억제하며, 간의 염증과 섬유증을 감소시켜 지방간을 개선하는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 MMF 투여에 의한 체중감량은 atorvastatin에 비하여 더 효과적이며, 간조직의 지방축적, 염증 정도와 섬유증 개선 효과는 atorvastatin과 대등한 것으로 생각된다.

결론

수컷 C57BL/6N 마우스의 고지방식으로 유도된 비알콜성 지방간 모델을 이용하여, 육신국의 투여에 의한 체중증가량과 간장내 지질대사 조절 관련 혈액 지표의 변화를 측정하였고, 간세포의 조직학과 형태학적 변화를 조사하여 다음의 결론을 얻었다.

1. MMF는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하였으며 그 효과는 MMF(2)에서 더 현저하였다.
2. MMF(3)은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈중 total cholesterol과 glucose의 농도가 낮은 것으로 나타났다.
3. MMF는 대조군에 비하여 간세포에서의 지방축적이 억제되었고, 염증 정도와 섬유화가 감소하였다. 그 효과는 MMF(2)에서 더 현저하였으며, 양성대조군인 atorvastatin의 효과와 유사하였다.
4. 지방간과 관련된 혈중 AST, ALT와 γ -GT의 농도는 MMF를 투여할 경우 대조군에 비하여 낮아지는 경향을 보였다.
5. MMF는 혈중 AST, ALT와 γ -GT의 농도가 생리적인 범위 안에 있으며 장기무게에 통계적으로 유의하게 차이가 없으므로 간독성으로부터 안전한 것으로 생각된다.

결론적으로 육신국은 체중감량효과가 있으며, 간조직의 지방축적을 억제하고 간세포의 염증 정도와 섬유증을 감소시켜 지방간을 개선하는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgement

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea

government(MEST) (No. 2012R1A2A2A01004508).

References

1. Jun DW. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2011 ; 17(3s) : 332-6.
2. Jun DW. Diet and exercise in nonalcoholic fatty liver disease. *PG*. 2013 ; 2013(1) : 41-5.
3. Yoon MY, Cho YK. Comorbid diseases in nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J med*. 2010 ; 79(5) : 490-4.
4. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Influence of dietary intake on non-alcoholic fatty liver disease in Korean. 2012 : 1.
5. Kam BS, Kim IR, Kim HC, Kook YB, Park YK, Seo BI, Seo YB, Song HJ, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lim KH, Cho SI, Jung JK, Ju YS, Choi HY. Herbal medicine. 1st ed, Seoul : Younglimsa, 2004 : 415-6.
6. Gao XM, Zhong GS. Application of differential commonly used in clinical medicine(Traditional Chinese Medicine). 1st ed, Beijing : People's Medical Publishing House, 2003 : 389-91.
7. Yun HR. GGH(3) reduces body weight gain and blood lipid metabolism in high fat diet-fed male mice C57BL/6N. DongEui Graduate School of Korean Medicine, a doctoral dissertation in Korean medicine, 2012 : 1-41.
8. Lee SH, Lim SW, Lee YM, Seo JW, Kim DK. Inhibitory effects of *Triticum aestivum* L. extracts on liver lipid accumulation in high fat-fed mice. *Kor J Pharmacogn*. 2011 ; 42(4) : 309-16.
9. Yun SH, Kim HJ. *Treasured Mirror of Eastern Medicine*, first edition, Gyeongsangnam-do : Donguibogam press, 2005 : 1735, 2008.
10. Park SH. Nonalcoholic fatty liver disease: treatment. *Korean J Med*. 2010 ; 79(5) : 481-9.
11. Ministry of Food and Drug Safety Oncology and Antibiotics Division. Is it ok with your liver? - Directions for the use of hepatitis medicine - Retrieved Nov. 30, 2011, from <http://www.mfds.go.kr>
12. Alisi A, Nobili V. Non-alcoholic fatty liver disease in children now: Lifestyle changes and pharmacologic treatments. *Nutrition*. 2012 ; 28 : 722-6.
13. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterol*. 1999 ; 116 : 1413-9.
14. Fan JG, Li F, Cai XB, Peng YD, Ao QH, Gao Y. Effects of non-alcoholic fatty liver disease on the development of metabolic disorders. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 ; 22 : 1086-91.
15. Shibata M, Kihara Y, Taguchi M, Tashiro M, Otsuki M. Nonalcoholic fatty liver disease is a risk factor for type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care*. 2007 ; 30 : 2940-4.
16. Brea A, Puzo J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Int J Cardiol*. 2013 ; 167 : 1109-17.
17. Park SH. Pharmacotherapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Korean J Hepatol*. 2013 ; 2013(1) : 46-51.
18. Sui XD, Deng HB, Liu TJ. Prevention and treatment of nonalcoholic fatty liver disease by traditional Chinese medicine. *World Chin J Digestol*. 2013 ; 21(18) : 1708-13.
19. Prineas RJ, Folsom AR, Kaye SA. Central adiposity and increased risk of coronary artery disease mortality in older women. *Ann Epidemiol*. 1993 ; 3 : 35-41.
20. Park HS, Kim MW, Shin ES. Effect of weight control on hepatic abnormalities in obese patients with fatty liver. *J Korean Med Sci*. 1995 ; 10 : 414-21.
21. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, Ash S, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut*. 2004 ; 53 : 413-9.
22. Park KS, Jang BK, Kwon KM, Chung WJ, Cho KB, Hwang JS, Ahn SH, Mun KC, Kim YH. Antioxidant status in nonalcoholic steatohepatitis. *Korea J Hepatol*. 2005 ; 11(2) : 135-43.
23. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits" ?. *Gastroenterol*. 1998 ; 114 : 842-5.
24. Moon JS, Kang BG, Ryu EK, Choi SM. A study of syndrome index differentiation in obesity. *J Korean Med Obes Res*. 2007 ; 7(1) : 55-69.
25. Kim MH, Jeoung SH, Lee SW, Kim HK, Park CS, Jeon BH, Oh HM, Rho MC. Effect of *Vigna angularis* on toll-like receptor activation and pro-inflammatory cytokine production. *Korean J Oriental Physiol Pathol*. 2012 ; 26(4) : 511-8.
26. Cho KH, Park JH, Byun BH, Lee ES, Choi HY, Seo BI, Byun SH. Effect of *Phaseoli Angularis* Semen on biochemical and histological changes of rats fed high fat diet. *J Korean Oriental Med*. 2002 ; 23(4) : 1-8.
27. Pak JU, Moon SJ, Moon G, Won JH. Effects of *Seman Armenicae* and *Radix Trichosanthis* on the iNOS expression and superoxide formation in the RAW264.7 cells. *J Kor Oriental Oncol*. 1999 ; 5(1) : 137-50.
28. Jung WS, Seo SW, Cho JJ, Son JW, Park MC, Choi CM, Yeom RS, Hwang SW, Kim YW, Song

- DS, Chae YS, Choi WS, NO JE, Yun HR, Kim YM, Park SJ, Shin MK, Song HJ. Extrat of Xanthii Fructus down-regulate TLR-4 mediated murine peritoneal macrophage inflammatory response by limiting NO synthase and I κ B- α degradation, Kor J Herbology. 2006 ; 21(3) : 103-9.
29. Baek GH, Cho SJ, Cho HJ, Hong GH, Kim HW, Cho SI. Effects of Anemarrhenae Rhizoma on anti-oxidative activities, Kor J Herbology. 2007 ; 22(3) : 101-7.
30. Ministry of Food and Drug Safety. Studies on the expansion of the negative list for food ingredients, 2009 : 239-42.
31. Zimmerman HJ, Seeff LB. Enzymes in hepatic disease In: Goodly, E.E., (Ed), Diagnostic Enzymology, Philadelphia : Lea and Febiger Publisher, 1970 : 1-38.
32. Kamimoto Y, Horiuchi S, Tanase S, Morino Y. Plasmaclearance of intravenously injected aspartate aminotransferase isozymes: evidence for preferential uptake by sinusoidal liver cells, Hepatology. 1985 ; 5 : 367-75.
33. Lee JH, Kang KH, Kim SH, Park JH, Cho CM, Kwon YO, Kim SK, Choi YH. The association of elevated alanine aminotransferase activity with obesity in health screenig subjects, Korean J Med, 2005 ; 69(1) : 46-54.
34. Kim GS, Choi YS, Park YH. The relationship between Fatty Liver and Parameters of Metabolic Syndrome in the Non Alcoholic Health Screen Examinees, Kosin Med J. 2006 ; 21(1) : 207-17.
35. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. Hepatology. 1995 ; 22 : 1714-9.
36. Cho YK. Pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease, Clin Mol Hepatol. 2008 ; 14(4s) : 42-53.
37. Luyckx FH, Desai C, Thiry A, Dewé W, Scheen AJ, Gielen JE, Lefèbvre PJ. Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. Int J Obes Relat Metab Disord. 1998 ; 22 : 222-6.
38. Fassio F, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies, Hepatology. 2004 ; 40 : 820-6.