大韓本草學會誌 제29권 제2호(2014년 3월)
Kor. J. Herbology 2014 ; 29(2) : 47-54

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2014.29.2.47.

고지방식이 C57BL/6N 모델에서 降脂丸의 농도별 비알콜성 지방간질환 개선효과

안예지[1#], 윤기현[1], 조주흠[2], 장두현[3], 정양삼[4], 김종훈[5],
김병출[6], 석화준[7], 유재상[8], 구자룡[9], 윤미정[10], 신순식[1*]

1 : 동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소, 2 : 우심한의원, 3 : 청남한의원, 4 : 정양삼한의원,
5 : 능인한의원, 6 : 고려한의원, 7 : 수정한의원, 8 : 봉황한의원, 9 : 소리청한의원, 10 : 목원대학교 바이오건강학부

Gangjihwan Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High Fat Diet-Fed C57BL/6N Mice

Ye Ji Ahn[1#], Ki Hyeon Yoon[1], Ju Heum Jo[2], Du Hyon Jang[3], Yang Sam Jung[4], Jong Hoon Kim[5], Byeong Chul Kim[6], Hoa Jun Seok[7], Jae Sang Yoo[8], Ja Ryong Ku[9], Michung Yoon[10], Soon Shik Shin[1*]

1 : Dept. of Formula Sciences and Research Institute of Korean Medicine for Diabetes and Obesity, College of Korean Medicine, Dong-Eui University,
2 : Woosim Korean Medicine Clinic, 3 : Chungnam Korean Medicine Clinic,
4 : Jungyangsam Korean Medicine Clinic, 5 : Neungin Korean Medicine Clinic, 6 : Goryo Korean Medicine Clinic,
7 : Soojung Korean Medicine Clinic, 8 : Bonghwang Korean Medicine Clinic
9 : Soricheong Luck Korean Medicine Clinic, 10 : Dept. of Life Sciences, Mok-Won University

ABSTRACT

Objectives : This study was undertaken to verify the effect of Gangjihwan(Di-fatty, DF) composed with Pakistani Ephedra Herba on nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) using high fat diet-fed male mice.

Method : Eight-week old C57BL/6N mice were used for all experiments. Standard chow diet-fed mice were used as normal group and high fat diet-fed NAFLD mice were randomly divided into 5 groups: control, atorvastatin, DF(1), DF(2) and DF(3). After 8 weeks, mice were treated with water, atorvastatin(10mg/kg) and DF(40, 80, 160mg/kg) for 8 weeks. And we investigated body weight gain, plasma lipid and glucose metabolism, histological analysis for liver on the mice.

Results : Compared with controls, DF-treated mice had very significantly lower body weight gain and lower visceral adipose tissue weight, the magnitudes of which were prominent in DF(3). Consistent with their effects on body weight gain, DF-treated mice had lower blood total cholesterol and triglyceride level compared with controls. Consistent with their effects on body weight gain and blood plasma lipid level, DF-treated mice had lower liver weight and hepatic lipid accumulation of DF-treated groups was significantly decreased than control group. Also Blood plasma AST, ALT and γ-GT concentration were not changed by DF, and these results may indicate DF do not show any toxic effects.

Conclusions : These results suggest that DF effectively improves NAFLD. DF reduces liver weight and prevents lipid accumulation of hepatocyte by reducing body weight gain and modulating blood plasma lipid metabolism levels.

Key words : Gangjihwan, DF, Di-fatty, nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD, triglyceride, cholesterol

*교신저자 : 신순식, 부산광역시 부산진구 양정로 52-57 동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소
· Tel : 051-850-7414 · E-mail : ssshin@deu.ac.kr
#제1저자 : 안예지, 부산광역시 부산진구 양정로 52-57 동의대학교 한의과대학 방제학교실 및 한방당뇨비만연구소
· Tel : 051-850-8647 · E-mail : loading5792@deu.ac.kr
· 접수 : 2014년 2월 12일 · 수정 : 2014년 3월 10일 · 채택 : 2014년 3월 12일

서 론

비알콜성 지방간질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 주 140g 미만의 알코올 섭취량에도 불구하고 간세포 내에 중성지방이 10% 이상 축적되어 있는 상태를 말한다[1]. 이것은 일반적으로 매우 적은 임상적 의미를 가진 부수적인 병리 소견으로 간주되었다[2]. 그러나 NAFLD는 대사증후군의 특성과 관련되어 있고, 비만한 사람과 제2형 당뇨병 환자에서 비만의 정도와는 독립적으로 그 유병률이 높았다[3]. 또한 심혈관질환 및 대사질환의 원인과 발병에서 중추적인 역할을 하는 것으로 보고되어[4] 대사증후군에서 발현되는 부수적인 증상이 아니라 적극적인 치료가 필요한 대상 질환으로 인식되고 있다.

降脂丸(Di-fatty, DF)는 麻黃, 大黃, 紫草로 구성된 방제로 현재 로컬 한의원에서 NAFLD 치료에 사용되고 있으며, 그 효과를 실험적으로 검증하기 위해 본 연구를 진행하였다.

麻黃(Ephedra sinica Stapf.)은 氣味가 辛, 微苦, 溫하고 歸經은 肺經, 膀胱經이다. 發汗解表, 宣肺平喘, 利水消腫의 효능이 있어 風寒感冒, 기관지 천식, 비염 등에 많이 응용되어 왔다[5]. 더불어 마황의 주요 성분인 ephedrine은 지방분해를 촉진하는 동시에 교감신경을 활성화시켜 대사효율을 높임으로써 음식 섭취량을 제한하지 않고도 비만환자에게서 비만 조절 효능을 보이는 것으로 보고되었다[6-8].

大黃(Rheum palmatum L)은 氣味가 苦, 寒하고 歸經은 脾經, 胃經, 大腸經, 肝經, 心包經이다. 瀉熱通腸, 凉血解毒, 逐瘀通經하는 효능이 있어 實熱便秘, 積滯腹痛, 血熱吐衄 등에 주로 활용되고 있다[6]. 여기에는 Sennoside, Rhein, Emodin, Chrysophanol, Aloe-emodin, Physcin, Rheum tannic acid, Gallic acid, Catechin, Tetrarin 등의 성분이 있으며, 고지혈증 및 비만의 개선효과가 있는 것으로 보고되었다[5,9].

紫草(Arnebia euchroma Johnst.)는 氣味가 甘, 鹹, 寒하고, 歸經은 心經, 肝經이다. 여기에는 Shikonin, Deoxyshikonin, β-Dimethylacrylalkannin 등이 있다. 凉血, 活血, 解毒하는 효능이 있어 抗炎, 抗過敏 작용이 필요한 피부 질환에 주로 사용된다[5].

본 연구에서는 체중감량이 간 지방증을 효과적으로 개선한다[10]는 보고 및 지방 축적은 직접적으로 간세포에 손상을 주고 염증 반응을 동반시킨다[11]는 점에 착안하여 체중 감량에 효과가 있는 麻黃과 지질대사 개선 효과가 있는 大黃 및 항염증 작용을 하는 紫草를 배합한 DF가 NAFLD의 개선에 효과가 있을 것으로 판단하여 검증을 실시하였다. 이를 위해 고지방식이 유발 수컷 NAFLD 마우스 모델을 이용하여 DF의 농도별 경구 투여가 NAFLD의 개선에 미치는 영향을 체중 증가량과 혈중 지질대사 관련 지표 및 간 조직 분석 등으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

㈜샘타코(샘타코바이오코리아 Inc., Korea)에서 공급한 7주령의 C57BL/6N 수컷 마우스를 구입하여 1주 간 실험실 환경에 적응하도록 한 후 사용하였다. 실험 기간 동안 온도 21±2 ℃, 습도 55±5 %, 환기 횟수 15~17 회/hour, 조도 150~300 lux, 그리고 조명에 12시간의 명암(점등: 06:00, 소등: 18:00) 주기가 있는 실험실 환경에서 고형사료(Harlan, USA)와 물을 자유롭게 공급 받았다.

2) 실험물질

실험물질인 DF의 조성약물은 화림제약(Busan, South Korea)에서 구입한 후 동의대학교 한의과대학 방제학교실에서 정선하여 실험에 사용하였다. 조성약물은 다음과 같고(Table 1), 마황은 파키스탄산 마황으로 구입하여 사용하였다.

Table 1. The composition of DF

韓藥名	Ingredient	%
麻黃	Ephedra sinica Stapf.	40
大黃	Rheum palmatum L	20
紫草	Lithospermum erythrorhizon Siebold et Zuccarini	40
	Total amounts	100

2. 방법

1) 실험군 및 투여방법

각 군당 9마리를 체중에 따라 무작위하게 군 분리를 실시하였다. 8주 동안 normal 그룹은 10Kcal% fat의 일반 식이를 공급하고, control, 양성대조군, 약물 그룹은 45Kcal% fat의 고지방식이를 공급하여 NAFLD를 유발하였다. 그 후 DF는 40, 80, 160mg/kg의 농도로, 양성대조군인 atorvastatin은 10mg/kg의 농도로[12] 8주간 경구 투여하였다(Table 2).

Table 2. Experimental groups

Group	Diet	Treatment	Number	Sex
Normal	10Kcal% fat	water	9	male
Control		water	9	male
Atorvastatin		10mg/kg	9	male
DF(1)	45Kcal% fat	40mg/kg	9	male
DF(2)		80mg/kg	9	male
DF(3)		160mg/kg	9	male

2) 체중 증가량 측정

DF(1), DF(2), DF(3) 및 atorvastatin이 체중 증가량에 미치는 영향을 알아보기 위해 약물을 투여하는 8주 동안 매주 2회씩 체중을 측정하고 체중 증가량을 계산하였다.

3) 혈액생화학 분석

혈액 채취는 경구 투여 시작 8주 후 12시간 절식한 뒤 diethyl ether로 마취한 다음 심장에서 혈액 1ml을 채취하였다. Blood clotting을 위해 30분 이상 실온에서 방치한 후 고속원심분리기(Micro12, Hanil, Korea)를 이용하여 3000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 분리된 혈장은 냉동고(-20℃)에 보관하고 혈액생화학분석기(Modular analytics, Roche, Germany)를 사용하여 asparate aminotransferase, alanine

aminotransferase, γ-glutamyl transferase, high density lipoprotein cholesterol(HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol(LDL-cholesterol), total cholesterol, triglyceride, glucose의 혈중 농도를 각각 측정하였다. Free fatty acid의 혈중 농도는 혈액생화학분석기(Modular analytics, Hitachi, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 혈중 insulin 농도는 혈액생화학분석기(Microplate reader, Molecular device, USA)를 사용하여 각각 측정하였다.

4) 동물부검

채혈한 뒤 부검하여 간장, 심장, 비장, 신장, 췌장 등의 각 장기 및 장간막 주변 백색지방조직(mesenteric adipose tissue, MAT), 생식기 주변 백색지방조직(epididymal adipose tissue, EAT)과 후복벽 주변 백색지방조직(retroperitoneal adipose tissue, RAT)의 무게를 측정하고 조직을 수집하였다.

5) 조직의 형태학적 분석

검체에서 분리한 조직은 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 이상 고정한 후 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 50% ethanol에서 2시간, 70% ethanol에서 2시간, 80% ethanol에서 2시간, 90% ethanol에서 2시간, 100% ethanol에서 2시간씩 3번 단계적으로 탈수시켰다. Xylen에서 1시간씩 3번의 투명과정 후 paraffin에 1시간씩 2번 침투를 실시하였다. 포매과정(embedding)을 거쳐 약 4 ㎛의 두께로 박절(paraffin-section)하여 slide에 조직을 얹고 건조시킨 다음 hematoxylen-eosin 염색을 하였다. Slide는 탈수과정을 거쳐 mounting medium(Sigma, MO, USA)을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 분석하였다. 조직의 사진촬영과 지방세포의 크기분석은 image analysis system(Image Pro-Plus, MD, USA)을 이용하였다.

3. 통계분석

모든 값은 mean ± standard deviation(SD)으로 표시하며, OriginLab Version 7.5(OriginLab Corporation, MA, USA)의 one way ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 체중 증가량과 지방무게

정상군에 비해 대조군은 체중 증가량이 40일째부터 유의하게 증가하였고($P<0.05$), 48일째부터 증가폭이 더욱 커져($P<0.01$) 56일째를 제외하고 실험 종료 시까지 증가폭이 유지되었다. 대조군에 비하여 DF(1)은 투여 후 4일째부터 유의하게 체중 증가량이 감소하였고($P<0.05$), 16일째까지 체중 증가량 감소폭이 증가하였다. 20일과 24일째에는 체중 증가량의 변화에 통계적인 유의성이 없었으나, 28일째부터 체중 증가량이 통계적으로 유의하게 감소하였고($P<0.05$), 32일째부터 그 정도가 증가하였으며($P<0.01$), 64일째에 가장 현저한 것으로 나타났다($P<0.001$). DF(2) 역시 투여 후 4일째부터 유의하게 체중 증가량이 감소하였고($P<0.05$), 그 감소폭이 증가하다가 20일째부터 잠시 감소폭이 줄어들었다. 32일째부터 다시 체중 증가량 감소폭이 증가하였고($P<0.01$), 그 양상이 유지되다가 64일째에 가장 현저하였다($P<0.001$). DF(3)은 투여 후 4일째부터 큰 폭으로 체중 증가량이 감소하였고($P<0.001$), 그 후로 체중 증가량의 감소폭이 약간 줄어들었다가 32일째부터 다시 증가하여($P<0.01$) 체중 증가량의 감소가 유지되다가 64일째에 가장 현저하였다($P<0.001$). Atorvastatin은 투여 후 4일째부터 유의하게 체중 증가량이 감소되어($P<0.05$) 24일째를 제외하고 체중 증가량의 감소폭이 유지되었다. 40일째에 체중 증가량의 감소폭이 증가하였으나($P<0.01$), 48일째에 다시 그 감소폭이 줄어들어($P<0.05$) 실험 종료 시까지 유지되었다 (Table 3, Fig. 1).

Table 3. Changes in body weight gain of DF against high fat diet-fed NAFLD mice

days	Normal	Control	Atorvastatin	DF(1)	DF(2)	DF(3)
4	−0.900±0.515	−0.607±0.785	−1.581±0.641*	−1.547±0.725*	−1.521±1.042*	−1.948±0.523***
8	−0.553±0.648	0.477±1.403	−1.544±1.635*	−2.503±1.336***	−2.459±0.835***	−2.578±0.496***
12	−0.409±0.852	−0.608±1.12	−2.207±1.566*	−2.652±1.162**	−2.521±1.090**	−2.380±0.875**
16	0.054±0.792	0.138±1.824	−1.993±1.432*	−1.841±0.721**	−2.592±0.884*	−2.162±1.205**
20	0.203±1.077	−0.884±1.767	−2.430±1.212*	−2.161±0.674	−2.517±0.995*	−2.588±1.02*
24	0.149±1.462	−0.692±1.525	−2.134±1.401	−1.536±0.777	−1.934±.801*	−2.828±1.429**
28	−0.173±1.213	−0.826±1.411	−2.571±1.605*	−2.096±1.009*	−2.059±0.864*	−2.873±2.322*
32	−0.071±1.246	0.766±1.512	−0.986±1.372*	−1.410±1.393**	−1.360±0.830**	−1.962±2.223**
36	0.109±1.609	1.273±1.551	−0.621±1.502*	−1.000±1.280**	−1.241±0.988***	−1.518±1.829**
40	0.326±1.828	2.223±1.659†	0.008±1.395**	−0.271±1.335**	−0.440±1.313**	−0.784±1.939**
44	0.757±1.676	2.922±1.877†	0.660±1.268**	0.116±1.666**	−0.202±1.175***	−0.459±1.881**
48	0.921±1.773	3.634±2.08††	1.427±1.209*	0.743±1.401**	0.451±1.325**	−0.003±1.717***
52	1.008±1.467	3.782±2.009††	1.600±1.289*	1.228±1.609**	0.939±1.295**	0.766±1.491**
56	1.531±1.637	4.124±2.123†	2.024±1.058*	1.421±1.492**	1.500±1.076**	1.048±1.06**
60	1.798±1.563	4.832±2.23††	2.623±1.119*	1.967±1.418**	1.712±1.200**	1.509±1.531**
64	2.196±1.879	5.554±2.406††	3.116±1.095*	1.416±1.384***	1.168±1.372***	0.993±1.6***

Data are expressed as the mean±SD. †Value significantly different from normal, †p<0.05, †† p<0.01. * Value significantly different from control, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

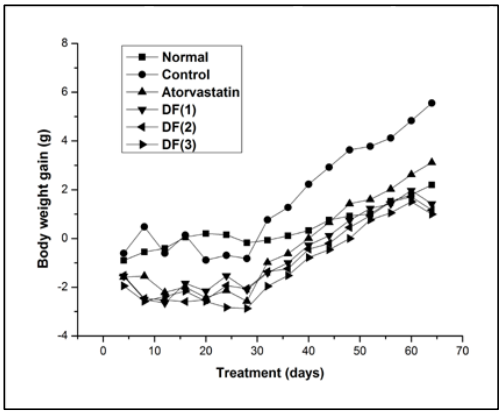

Fig. 1. Changes of body weight gain in high fat diet-fed NAFLD mice.

이를 백분율로 환산할 경우, 대조군에 비해 DF(1)은 59.37%, DF(2)는 65.25%, DF(3)은 69.67%의 체중 감량효과가 있는 것으로 나타났다. 모든 농도에서 통계적으로 매우 현저한 체중 감량효과가 있었고($P<0.001$), 농도 의존적인 체

중 감량효과를 보였다. Atorvastatin의 경우 대조군에 비해 28.12%의 체중 감량효과가 있었으며, 통계적으로 유의한 체중 감량효과를 보였다(P<0.05).

지방조직의 경우 MAT, EAT 및 RAT의 모든 지방조직에서 대조군은 정상군에 비하여 그 무게가 통계적으로 유의하게 증가한 양상을 보였다. MAT의 경우, 대조군에 비해 그 무게가 DF(1)은 14.71%, DF(2)는 14.67%, DF(3)은 15.03% 감소하였고, atorvastatin은 4.61%감소하였다. 이 중 DF(1)과 DF(3)에서 통계적인 유의성이 있는 것으로 나타났다(p<0.05). EAT에서는 대조군에 비해 DF(1)은 4.08%, DF(2)는 3.99%, DF(3)은 3.05%, atorvastatin은 2.88%로 그 무게가 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. RAT의 경우는 대조군에 비해 DF(2)는 5.17%로 그 무게가 감소하였고, DF(1)은 5.4%, DF(3)은 3.83%, atorvastatin은 0.59%의 정도로 그 무게가 오히려 증가하였다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Adipose tissue weights in high fat diet-fed NAFLD mice

	Adipose tissue weight (g)					
	Normal	Control	Atorvastatin	DF(1)	DF(2)	DF(3)
MAT	0.638±0.137	1.692±0.219†††	1.543±0.258	1.258±0.494*	1.259±0.598	1.249±0.508*
EAT	1.431±0.278	1.875±0.527†	1.770±0.407	1.704±0.485	1.731±0.304	1.764±0.487
RAT	0.477±0.081	0.753±0.12†††	0.762±0.15	0.839±0.171	0.679±0.14	0.813±0.118

Data are expressed as the mean±SD. †Value significantly different from normal, † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001. * Value significantly different from control, * p<0.05. MAT = mesenteric adipose tissue; EAT = epididymal adipose tissue; RAT = retroperitoneal adipose tissue.

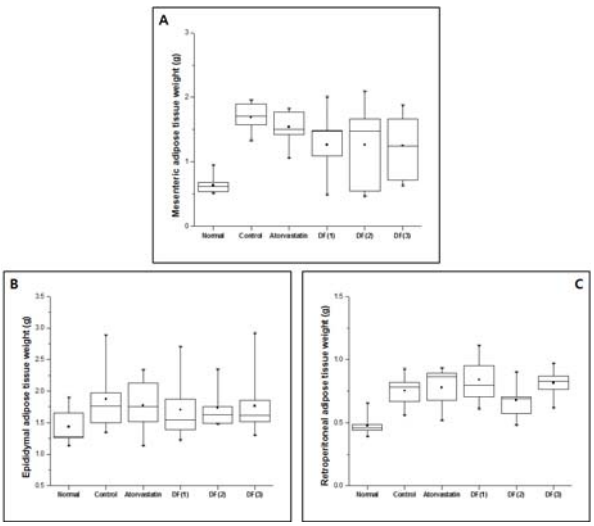

Fig. 2. Adipose tissue weights in high fat diet-fed NAFLD mice. (A) Mesenteric adipose tissue; (B) Epididymal adipose tissue; (C) Retroperitoneal adipose tissue.

2. 혈액생화학분석

1) 혈중 asparate aminotransferase, alanine aminotransferase와 γ-glutamyl transferase (γ-GT) 농도

약물 투여 시작 8주 후 혈장 내 asparate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 및 γ-glutamyl transferase(γ-GT)의 농도를 측정한 결과, DF의 세 농도와 atorvastatin에서 모두 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 5, Fig. 3).

Table 5. Blood analysis data in high fat diet-fed NAFLD mice

	Unit	Blood analysis data					
		Normal	Control	Atorvastatin	DF(1)	DF(2)	DF(3)
AST	U/L	156.33±42	212.56±103.5	178.00±159.71	180.67±55.03	165.44±39.9	158.44±51.56
ALT	U/L	28.89±4.6	95.22±42.97†††	60.67±48.4	84.56±72.6	62.44±50.92	57.67±43.22
γ-GT	U/L	0.43±0.05	0.44±0.13	0.38±0.14	0.37±0.087	0.38±0.07	0.43±0.11
TC	mg/dl	157.44±14.49	201.22±23.37†††	160.78±17.19***	167.33±50.03	164.22±38.14*	168.44±29.69*
HDL	mg/dl	137.44±11.75	158.78±14.71††	137.56±14.13**	138.89±39.14	137.56±26.48	145.22±22.54
LDL	mg/dl	20.67±5.81	40.11±9.49†††	24.78±6.06***	31.89±14.39	28.11±11.29*	31.89±11.75
TG	mg/dl	78.67±13.15	90.33±17.94	72.67±13.72*	83.56±7.45	73.44±5.55*	76.00±6.16*
FFA	μEq/L	977.89±163.58	879.00±109.02	868.89±96.94	990.89±81.05†	965.78±122.74	962.78±93.67
Glucose	mg/dl	177.22±20.27	213.67±44.4†	200.56±32.17	191.33±36.74	172.44±31.63	187.56±38.3
Insulin	ng/dl	0.81±0.47	2.23±0.87†††	2.93±1.47	1.74±1.26	1.55±1.09	2.24±1.7

Data are expressed as the mean±SD. †Value significantly different from normal, † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001. * Value significantly different from control, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

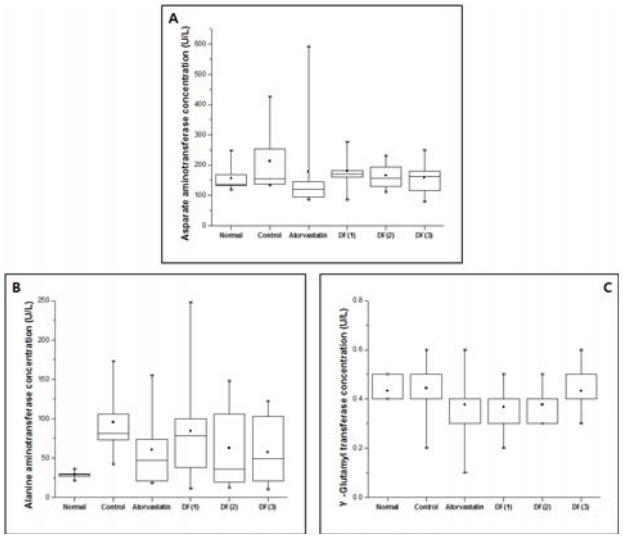

Fig. 3. Fasting plasma asparate aminotransferase(A), alanine aminotransferase(B) and γ-glutamyl transferase(C) levels in high fat diet-fed NAFLD mice.

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

약물 투여 시작 8주 후 혈장 내 total-cholesterol, HDL-cholesterol과 LDL -cholesterol의 농도를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비하여 모든 값에서 통계적으로 유의하게 높은 수치를 보였다. Total cholesterol의 경우 대조군에 비하여 모든 약물 그룹은 낮은 수치를 보였고, DF(2), DF(3)와 atorvastatin에서 통계적인 유의성이 있었다(Table 5, Fig. 4-A). 혈장 내 HDL-cholesterol의 농도는 대조군에 비하여 모든 약물 그룹에서 낮은 수치를보였고, atorvastatin에서만 통계적인 유의성이 있었다(Table 5, Fig. 4-B). 혈장 내 LDL-cholesterol의 경우, 대조군에 비해 모든 약물 그룹에서 낮은 수치를 보였으며, DF(2)와 atorvastatin에서 통계적인 유의성이 있었다(Table 5, Fig. 4-C).

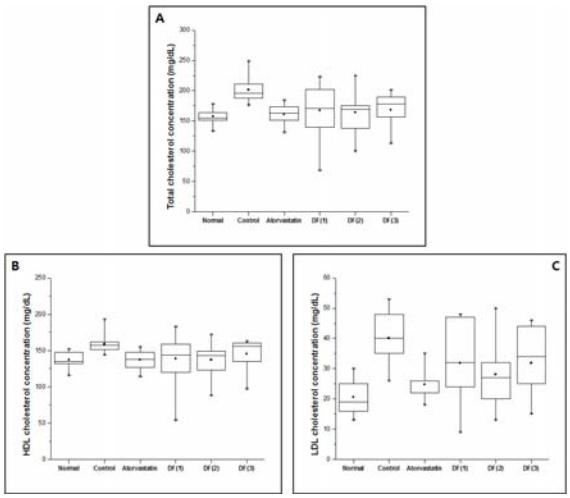

Fig. 4. Fasting plasma total cholesterol(A), HDL-cholesterol(B) and LDL-cholesterol(C) levels in high fat diet-fed NAFLD mice. HDL = high density lipoprotein; LDL = low density lipoprotein.

3) 혈중 free fatty acid와 triglyceride 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 triglyceride와 free fatty acid의 양을 측정한 결과, triglyceride의 값은 대조군에 비하여 모든 약물 그룹에서 그 수치가 낮았으며 DF(2), DF(3)와 atorvastatin에서 통계적인 유의성이 있었다(Table 5, Fig. 5-A). 혈중 free fatty acid 농도의 경우 대조군에 비하여 atorvastatin에서 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. DF의 모든 그룹은 대조군에 비해 높은 값을 보였으며, DF(1)에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(Table 5, Fig. 5-B).

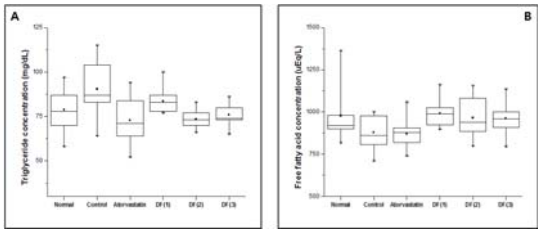

Fig. 5. Fasting plasma triglyceride(A) and free fatty acid(B) levels in high fat diet-fed NAFLD mice.

4) 혈중 glucose와 insulin 농도

실험시작 8주 후 혈장 내 glucose와 insulin의 양을 측정한 결과, glucose의 값은 대조군과 비교하여 모든 약물 그룹에서 낮은 수치를 보였으며 DF(1)에서 통계적인 유의성이 있었다(Table 5, Fig. 6-A). Insulin의 값은 대조군과 비교하여 DF(1)과 DF(2)에서 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 5, Fig. 6-B).

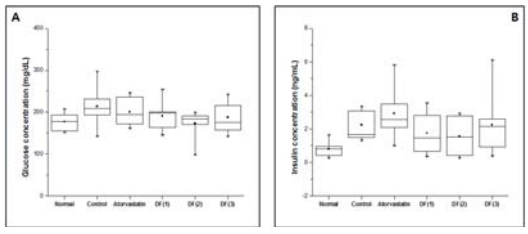

Fig. 6. Fasting plasma glucose(A) and insulin(B) levels in high fat diet-fed obese mice.

3. DF에 의한 간조직의 무게와 지방축적 변화

1) 간장 무게

실험종료 후 부검 시 간장의 무게를 측정한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 통계적으로 유의하게 그 무게가 증가하였다. 대조군에 비하여 DF(1)은 5.66%, DF(2)는 9.83%, DF(3)은 11.02%, atorvastatin은 8.33%로 그 무게가 감소하였으나, 통계적인 유의성은 없었다(Table 6, Fig. 7).

Table 6. Liver weights in high fat diet-fed NAFLD mice

	Normal	Control	Atorvastatin	DF(1)	DF(2)	DF(3)
Liver weights(g)	1.094±0.106	1.587±0.332†††	1.343±0.283	1.417±0.57	1.303±0.419	1.272±0.383

Data are expressed as the mean±SD. †Value significantly different from normal, ††† $p<0.001$.

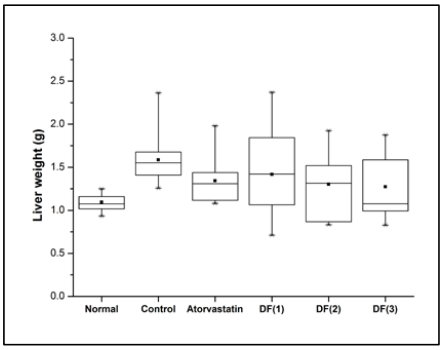

Fig. 7. Liver weights in high fat diet-fed NAFLD mice.

2) 간조직의 지방축적 변화

고지방식이로 NAFLD가 유발된 Control 그룹 마우스는 상당량의 지방이 축적된 소견을 보였으나, DF를 투여한 그룹에서는 간의 지방축적이 감소된 양상을 보였다. 정상군에 비해 대조군은 통계적으로 유의하게 lesion score가 증가하였고, 모든 약물 그룹은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 그 정도는 DF(2)에서 더욱 현저하였다. 이를 백분율로 환산하면 DF(1)은 44.74%, DF(2)는 57.15%, DF(3)은 42.85% 감소하였고, AS는 27.9%의 감소폭을 보였다(Table 7, Fig. 8).

Table 7. Histological analysis of hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed NAFLD mice

	Normal	Control	Atorvastatin	DF(1)	DF(2)	DF(3)
Lesion score	0.933±0.115	3.667±0.306†††	2.067±0.306	1.400±1.058*	1.000±0.4***	1.467±0.416**

Data are expressed as the mean±SD. †Value significantly different from normal, ††† $p<0.001$. * Value significantly different from control, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

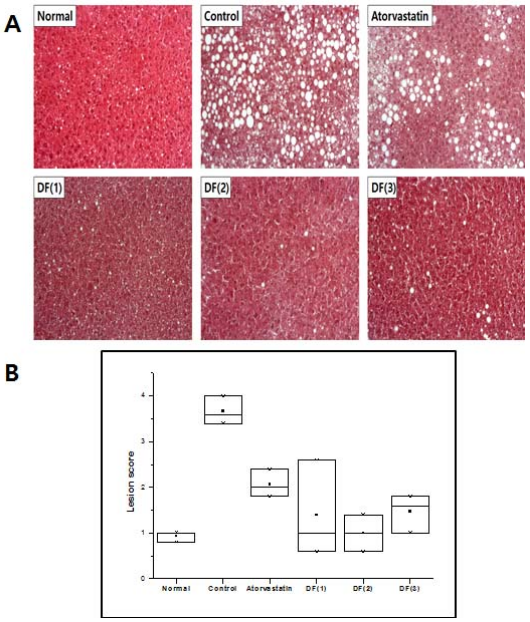

Fig. 8. Inhibition of hepatic lipid accumulation by DF in high fat diet-fed NAFLD mice. (A) Representative hematoxylin and eosin stained sections of livers are shown (original magnification X 100). (B) Pathological scores of hepatic accumulation are as follows: 0, no lesion; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; 4, very severe.

고 찰

비알콜성 지방간질환(NAFLD)은 서구사회에서 가장 일반적인 만성 간질환으로 비만 및 대사증후군과 밀접하게 관련되어 있다[13]. 우리나라 성인의 NAFLD 유병률은 2004년 11.5%에서 2010년 23.6%로 두 배 정도 증가했는데, 이는 미국 및 유럽의 성인 유병률 16~25%와 비슷한 수준이다[14]. 현재 NAFLD는 비만 비율의 극적인 증가에 따라 급속하게 확산되고 있는 것으로 여겨진다. 그러나 체중 감량 외에는 검증된 치료법이 없다는 점에서 분명하고 정확한 치료법이 필요하다[15].

麻黃은 대표적인 發散風寒藥으로[16] 최근에는 항비만 효과가 알려져 임상에서 많이 활용되고 있는데, 2000년 이후 비만에 한약을 사용한 논문을 조사한 결과 국내와 해외 논문 모두 개별 본초로서의 빈도는 麻黃이 가장 높은 것으로 나타났다[17]. 麻黃에 함유된 ephedrine은 교감신경 흥분작용과 중추흥분 및 체중감소작용이 있고, psudoephedrine에는 뚜렷한 이뇨작용이 있으며, 두 가지 모두에는 기관지 확장작용이 있으며 기타 항염증 작용 및 혈당 강하작용을 가지고 있다[18].

大黃은 瀉下藥 중 攻下藥에 속하는 한약으로[19] 고지혈증 저하 효과[20,21], 혈관이완효과[22] 등이 보고되었고, 최근에는 당뇨병 백서의 죽상경화증 예방 및 치료 효과[23] 및 고지방식이로 유발된 肥滿白鼠에 대한 大黃 약침의 항비만효과[24] 등이 보고되었다.

紫草는 凉血活血, 解毒透疹하는 효능이 있고[16], 최근에는 아토피 피부염 관련 효과[25]와 紫草 추출물이 TNF-α, IL-6 등의 생성을 억제하여 항염증효과를 가진다는 연구결과[26,27]가 보고되었다.

위와 같은 麻黃의 항비만 효과, 大黃의 항고지혈증 작용과 紫草의 항염증 작용은 간의 염증 및 과체중, 고지혈증을 기본 특성으로 하는 NAFLD에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되어 이 세 가지 약물로 降脂丸(DF)을 구성하고 고지방식이 NAFLD 모델 마우스를 이용하여 NAFLD의 개선에 미치는 영향을 조사하였다.

체중 증가량의 경우, DF(1)은 59.37%, DF(2)는 65.25%, DF(3)은 69.67%의 체중 감량효과를 보였으며 세 그룹 모두 통계적인 유의성을 보였다($P<0.001$). Atorvastatin의 경우 28.12%의 체중 감량효과를 보였으며 통계적인 유의성이 있었으나($P<0.05$) DF에 비해서는 그 효과가 낮은 것으로 나타났다. MAT의 경우 대조군에 비해 DF(1)은 14.71%, DF(2)는 14.67%, DF(3)은 15.03%, atorvastatin은 4.61%로 그 무게가 감소하였고, EAT의 경우 대조군에 비해 DF(1)은 4.08%, DF(2)는 3.99%, DF(3)은 3.05%, atorvastatin은 2.88%로 그 무게가 감소한 것으로 나타났으며, RAT의 경우 대조군에 비하여 DF(2)에서만 5.17%로 그 무게가 감소하였다. 지방 무게의 감소는 DF 투여 그룹이 atorvastatin 투여 그룹보다 그 정도가 큰 것으로 나타나 체중 감량효과와 일치하였다. 특히 MAT의 무게가 통계적으로 유의하게 감소하여 DF가 내장지방의 개선에 기여할 수 있다고 생각된다.

DF의 지질대사 개선 효과를 알아보기 위해 관련 지표인 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, free fatty acid, glucose, insulin의 농도를 조사하였다. DF(1)은 대조군에 비하여 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, glucose, insulin의 농도 값이 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. DF(2)는 대조군에 비해 혈중 total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, glucose의 농도 값은 통계적으로 유의한 차이를 보였고, HDL-cholesterol, insulin의 농도 값은 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다. DF(3)은 대조군에 비해 혈중 total cholesterol, triglyceride의 농도 값이 통계적으로 유의하게 감소하였고, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, glucose의 농도 값은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. Atorvastatin은 대조군에 비해 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride의 농도 값이 통계적으로 유의한 차이를 보였으며, free fatty acid와 glucose의 농도 값은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

체중감량효과와 일치하게 혈중 total cholesterol, triglyceride의 농도 값이 DF(2)와 DF(3)에서 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타나 DF(2)와 DF(3)의 투여가 체중을 감량시키고 더불어 혈중 지질대사를 개선할 수 있음을 보여준다. 특히 DF(3)는 MAT의 무게 또한 유의한 차이를 보여 내장지방 개선에 기여할 수 있을 것으로 보인다.

DF의 NAFLD 개선 효과를 알아보기 위해 간장의 무게와 간 염증 지표 및 간세포의 조직학적, 형태학적 변화를 조사하였다. 간장의 무게는 대조군에 비해 DF(1)은 5.66%, DF(2)는 9.83%, DF(3)은 11.02%, atorvastatin은 8.33%로 그 무게가 감소하여 체중과 지방무게의 변화와 일치하게 간장의 무게가 감소하는 양상을 보였다. 이와 일치하게 간세포의 지방축적은 모든 약물 그룹에서 대조군에 비하여 lesion score를 감소시켰으며, 그 정도는 DF(1)에서 44.74%, DF(2)에서 57.15%, DF(3)에서 42.85%, AS에서 27.9%로 나타났다. 따라서 DF는 간세포의 지방축적을 억제하여 간장의 무게를 감

소시키고 NAFLD를 개선하는데 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

또한 간 염증 지표인 asparate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ-glutamyl transferase (γ-GT)의 농도를 조사하였다. 혈중 AST, ALT와 γ-GT의 농도 값은 DF의 세농도 모두에서 대조군에 비해 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 혈중 ALT 농도는 NAFLD에서의 간장 손상 정도를 예측할 수 있는 지표이며 증가된 혈중 ALT 농도는 간섬유화 등 상당한 간의 조직학적 이상을 보여주는 것으로 보고되어 있어[28], DF의 투여가 이를 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

그러므로 DF는 체중증가량을 감소시키고 혈중 지질대사를 개선하며 이에 따라 간의 무게와 간세포의 지방 축적이 감소시켜 NAFLD의 개선에 기여할 수 있을 것으로 생각되며 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

결 론

고지방 식이로 유발된 NAFLD 수컷 C57BL/6N 마우스 모델을 이용하여 降脂丸(DF)의 농도별 투여에 따른 체중증가량, 혈중 지질대사 관련 지표의 변화와 지방조직 및 간조직의 변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DF는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 체중증가량이 감소하였고, 내장지방의 무게가 적게 나가는 것으로 나타났으며, 그 효과는 DF(3)에서 더욱 현저하였다.

2. DF는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 혈중 total cholesterol과 triglyceride의 농도가 낮은 것으로 나타났다.

3. DF는 간장의 무게를 감소시키고, 간세포의 지방 축적을 감소시키는 것으로 나타났다.

4. DF는 혈중 간장 독성지표가 생리적인 범위 내에 있고 장기에 이상이 없는 것으로 보아 간장독성으로부터 안전할 것으로 생각된다.

결론적으로 DF는 체중증가량을 감소시키고 혈중 지질대사를 개선하며 이에 따라 간의 무게와 간세포의 지방 축적이 감소되어 NAFLD의 개선에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2012R1A2A2A01004508).

References

1. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. J Hepatol. 2005 ; 42(1) : 132-8.
2. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome. Diabetes. 2001 ; 50 : 1844-50.
3. MGaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. Nutrients. 2013 ; 5 : 1544-60.
4. Reynoso E, Lavine JE. NAFLD: The role of exercise in treating NAFLD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012 ; 9 : 368-70.
5. Shen YJ. Pharmacology of traditional Chinese Medicine. First edition. Beijing : People's Medical Publishing House. 2000 : 111-5.
6. Wang YS, Deng WL, Xue CS. The application and pharmacology of traditional Chinese Medicine. Second edition. Beijing : People's Medical Publishing House. 2000 : 1105-19.
7. Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, Maglione M, Mojica WA, Suttorp MJ, Rhodes SL, Jungvig L, Gagné J. Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. JAMA. 2003 ; 289(12) : 1537-45.
8. Vukovich MD, Schoorman R, Heilman C, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Caffeine-herbal ephedra combination increases resting energy expenditure, heart rate and blood pressure. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005; : 32(1-2) : 47-53.
9. Tian JY, Chen L, Zhang XL, Li J, Han J, Fu JY, Yang XM, Zhang PC, Ye F. Investigation of a compound, compatibility of Rhodiola crenulata, Cordyceps militaris, and Rheum palmatum, on metabolic syndrome treatment II - improving obesity. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2013 ; 38(9) : 1411-5.
10. Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. Diabetes Metab. 2000 ; 26 : 98-106.
11. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009 ; 19 : 291-302.
12. Kim TK, Jung WS, Park SW, Cho KH, Kim YS. Comparison of efficacy and safety between Chunghyul-dan(HH-333) and Atorvastatin(Lipitor®). Kor J Orient Int Med. 2003 ; 24(4) : 837-45.
13. Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic

fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. Obes Rev. 2010 ; 11 : 430-45.
14. Korea Food & Drug Administration. The press release. Retrieved Nov. 14, 2013, from http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=675&seq=19618&cmd=v.
15. Durazzo M, Belci P, Collo A, Grisoglio E, Bo S. Focus on Therapeutic Strategies of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int J Hepatol. 2012 ; 2012 : 464706.
16. Professors of herbology in college of oriental medicine. Herbology. Seoul : Younglimsa. 2006 : 154-6, 240-1.
17. Hwang MJ, Shin HD, Song MY. Literature Review of Herbal Medicines on Treatment of Obesity Since 2000 - Mainly about Ephedra Herba. J Kor Med Obes Res. 2007 ; 7(1) : 39-54.
18. Joh HG, Yang JM, Kim DI. Effects of the oral administration of Epedra Sinica Extract on suppression of body weight gains and the DNA chip expression of obese rats. J Kor Med Obstet Gynecol. 2007 ; 20(3) : 65-80.
19. Cheon MS, Yoon TS, Choi GC, Kim SJ, Lee AY, Moon BC, Choo BK, Kim HK. Comparative Study of Extracts from Rhubarb on Inflammatory Activity in Raw 264.7 Cells. Kor J Med Crop Sci. 2009 ; 17(2) : 109-14.
20. Son YJ, Kim YS, Lee YJ. The Effects of Rhei palmati Radix and Rhei undulati Radix on the Blood Lipids and Enzymes of Hypercholesterolic Rats. Kor J Herbology. 1999 ; 14(1) : 61-8.
21. Lee YJ. The Effects of Fraction Obtained from Rhei Rhizoma on the Blood Lipids in Hypercholesterol Rats. Kor J Herbology. 2000 ; 15(2) : 87-93.
22. Kim HH, Park SY, Ahn DK, Park SK. Vasodilation Effects between the Water Extract of Rheum palmatum L. and R. undulatum L. in Rat Thoracic Aorta. Kor J Herbology. 2004 ; 19(3) : 99-105.
23. Jang TY, Nam SK, Kim HG, Kim HY, Lee JS, Jung HA, Ko YC, Shin SH. Effects of Radix et Rhizoma Rhei on the Renal Function and Vessel in the Diabetic Rats. Kor J Orient Intern Med. 2006 ; 27(4) : 845-54.
24. Ryu HS, Kim SP, Kim SM, Lee DG, Lee OJ, Lee JH, Wei TS. The effects of Rhei Radix et Rhizoma Pharmacopuncture at Bi-Su(BL_{20}) on the Obese Rats Induced by High Fat Diet. The Acupuncture. 2012 ; 29(3) : 9-18.
25. Ju JH, Cho HH, Lee YS. Progress on Phytochemical and Atopic Dermatitis-related Study of the Root of Lithospermum erythrorhizon. Kor J Pharmacogn. 2010 ; 41(2) : 73-88.
26. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, Lee GS, Park SJ, Song HJ. The anti-inflammatory effect of Lithospermum Erythrorhizon on lipopolysaccharide - induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. Kor J Herbology. 2013 ; 28(2) : 67-73.
27. Kwon MH, Lee JY, Kim DG. Anti-allergic and Anti-inflammatory Effects of Jacho(Lithospermum Erythrorhizon). J Kor med. 2005 ; 26(3) : 110-23.
28. Molleston JP, Schwimmer JB, Yates KP, Murray KF, Cummings OW, Lavine JE, Brunt EM, Scheimann AO, Unalp-Arida A. Histological Abnormalities in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Normal or Mildly Elevated Alanine Aminotransferase Levels. J Pediatr(in press).