

# 치자 추출물의 지방대사조절을 통한 비알콜성 지방간 유도 인슐린저항성 개선 효과

서일복 · 안상현 · 정한솔<sup>1</sup> · 김기봉<sup>2,3\*</sup>

세명대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부,  
2: 부산대학교 한의학전문대학원 소아과학교실, 3: 부산대학교한방병원 한방소아과

## Effect of *Gardenia Jasminoides* on Insulin Resistance Induced by Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Il-bok Seo, Sang Hyun Ahn, Han Sol Jeong<sup>1</sup>, Ki Bong Kim<sup>2,3\*</sup>

Department of anatomy, college of Korean Medicine, Semyung University,

1: Division of Applied Medicine, 2: Department of Pediatrics, School of Korean Medicine, Pusan National University,

3: Department of Korean Pediatrics, Korean Medicine Hospital, Pusan National University

*Gardenia jasminoides* is an herbal medicine that treats obesity and dampness-phlegm. This study aimed to investigate the efficacy of *Gardenia jasminoides* on insulin resistance induced by Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). 8-week-old C57BL/6 male mice were divided into three groups: control group (Ctrl), high-fat diet group (HFF), and high fat diet with *Gardenia jasminoides* extract administration group (GJT). Each 10 mice was allocated to each group (a total of 30 mice). All mice were allowed to eat fat-rich diet freely throughout the experiment. To examine the effect of *Gardenia jasminoides*, we observed weight changes, lipid blot distributions, PPAR- $\gamma$ , p-IkB, p-JNK in liver tissue, total cholesterol, and glucose levels in serum. Comparing of body weight measurements between 3 groups, in the GJT group, weight gain was significantly suppressed compared to the HFF group. The distribution of lipid blots and positive reaction of PPAR- $\gamma$  were significantly lower in GJT group. The expression levels of p-IkB and p-JNK that plays critical roles in the development of insulin resistance were significantly decreased by GJ treatment. Total cholesterol and glucose levels in serum were also significantly lower in GJT group. *Gardenia jasminoides* has the effect of improving non - alcoholic fatty liver induced insulin resistance through the regulation of lipid metabolism.

keywords : *Gardenia jasminoides*, NAFLD, Insulin resistance, Obesity

### 서론

비알콜성 지방간질환 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 실제 다량의 알코올 섭취를 하지 않음에도 불구하고 알코올 간염과 유사한 조직학적 소견을 보이며, 간세포에 지방의 과도한 축적만 있는 단순 지방증 (simple steatosis), 간세포의 염증, 괴사, 섬유화를 동반하는 비알콜성 지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 보다 더 진행된 간경변증을 모두 포함한다<sup>1)</sup>. 국내에서는 식생활의 변화로 비만이 급격하게 증가함에 따라 NAFLD의 유병률 또한 급격히 증가하였는데, 2004년 11.5%에서 2010년 23.6%로 6년 사이 2배 넘게 증가하였다<sup>2)</sup>. 성인 뿐 아니라 최근에는 청소년에서도 비만 유병률이 증가하고 있으며<sup>3)</sup>, 이와 동시에 대사증후군 및 NAFLD의 유병률도 꾸준히 증가하고 있다<sup>4,5)</sup>.

특히 NAFLD은 간질환에서만 끝나는 것이 아니라 인슐린저항성을 유발하여 당뇨와 대사증후군 등의 발병까지 일으킬 수 있으므로 적극적인 치료가 필요하다<sup>6)</sup>.

현재 지방간 치료제로 표준화된 치료제는 없으며, 다만 식이 조절이 치료방법으로 제시되어 있다. 따라서 당뇨 진단을 받기 전에 나타날 수 있는 인슐린저항성에는 개인의 생활 습관 교정 이외에 마땅한 방법이 없다<sup>7)</sup>. 특히 NAFLD의 경우에는 연령이 증가할수록 체중감량의 어려움이 있으며, 지방간, 당뇨 환자들 중 저체중인 경우도 많아서 인슐린저항성을 개선할 수 있는 근본적인 치료제 개발이 필요하다. 현재 인슐린저항성 치료제로 판매중인 Metformin은 당뇨 진단을 받은 후에 투여되고 있으며, 환자가 간기능장애가 있으면 투여할 수 없는 문제점이 있다<sup>8)</sup>. 인슐린저항성 치료에 대한 수요는 해마다 급격히 증가하고 있으며, 이로 인해 관

Kibong Kim, Department of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital, Geumo-ro 20, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea

·E-mail : kkb2630@gmail.com ·Tel : +82-55-360-5952

·Received : 2019/09/16 ·Revised : 2019/10/24 ·Accepted : 2019/10/25

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.10.33.5.288>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

련 연구가 진행되어 최근 간의 지방합성 과정에 관여하는 LIPIN1이 인슐린저항성과 연관이 있다는 연구결과가 나왔다. 그러나 아지와 관련된 치료제 개발은 미진한 실정이다<sup>9-11</sup>).

치자(梔子)는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본에서 많이 재배되고 있으며, 청열해독(淸熱解毒), 이습소황(利濕消黃), 활혈지혈(活血止血)의 효능이 있고, 간질환에 인진(茵陳), 시호(柴胡)와 더불어 사용빈도가 대단히 높은 약물이다<sup>12</sup>).

치자가 간질환에 미치는 영향에 관한 선행연구로 치자 단독의 연구결과는 거의 전무한 상태이며, 인진호탕(茵陳蒿湯)을 사용한 연구가 대부분을 차지하였다<sup>13,14</sup>).

한의학에서는 비만이나 지방간 같은 질환은 간의 기혈순환 기능이 저하되어 습담이 쌓여 생긴다고 인식하였다. NAFLD에 대한 한약 치료의 선행연구로 인진<sup>14</sup>), 적소두<sup>15</sup>), 곤포<sup>16</sup>), 강지환(降脂丸)<sup>17</sup>), 가미소체환(加味消滯丸)<sup>17</sup>), 청간탕(淸肝湯)<sup>18</sup>) 등을 이용한 세포 및 동물실험에서 유의한 효과가 있음이 보고된 바 있다. 또한 최근에는 지방간과 당뇨가 서로 연관성이 있다는 연구결과가 나오기도 하였다<sup>19</sup>). 이러한 내용들을 토대로 하여 치자와 같은 청열이습(淸熱利濕)하는 약제가 지방간 및 인슐린저항성에 대한 개선 가능성이 있을 것으로 생각되어 본 연구를 시작하게 되었으며, 생쥐에게 24주 동안 고지방식이 섭취를 통해 NAFLD를 유발한 생쥐에서 치자 추출물의 지방대사조절을 통하여 인슐린저항성을 조절하는데 효과가 있음을 확인하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

태령 6주 C57BL/6계 수컷 생쥐 (오리엔트, 한국)를 무균사육 장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20 g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군 (Ctrl), 고지방식이섭식군 (HFF), 고지방식이섭식와 치자 추출물투여군 (GJT)으로 나누어, 각 군에 10마리씩 배정하였다. 실험기간 24주 동안 high fat diet (fat, 60%; carbohydrate, 20%; protein, 20%; DIO DIET, USA)를 자유섭식시켰다.

동물실험은 세종대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (smecae-2017-08-01)을 받았으며, 실험실 동물의 관리와 사용은 NIH 가이드라인에 따라 시행되었다.

### 2. 치자 추출물의 제조와 투여

치자(*Gardenia jasminoides*) 100 g을 증류수 1000 mL에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 mL로 감압, 농축한 후 동결 건조하여 추출물 21 g (수득률 21%)을 얻었다. 획득된 치자 추출물 (28 mg/kg)을 생리식염수 (100 µL)에 녹인 후 고지방식이 16주 섭식 후 8주 동안 GJT에 경구투여 하였다. Ctrl과 HFF는 생리식염수 (100 µL)만 경구투여 하였다.

### 3. 혈액 검사

혈액검사는 치자 추출물 투여 8주 후 심장천자를 통해 얻어진

혈액을 통해서 이루어졌다. Total cholesterol은 혈청을 분리 후 Cholesterol E kit (BC 108-E, 영동제약, 한국)로 측정하였다. 혈당은 채취된 혈액을 혈당계 (Freestyle, Therasence Inc, USA)로 측정하였다.

### 4. DXA-Fat

sodium pentobarbital로 마취하였으며, x-ray absorptiometry (Inalyzer, Medikors, 서울, 대한민국)를 사용하여 지방분포를 분석하였다.

### 5. 조직화학

간조직을 10% Neutral buffered formalin 용액에 12시간 동안 처리하였다. 고정된 조직은 파라핀 (Sigma, USA)에 포매하여 5 µm 두께의 연속절편으로 제작되었다.

지방화에 따른 간조직내 형태변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 우선 50-60 °C Bouin 용액에서 1시간 동안 매염 처리를 한 후 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵을 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 15분간, aniline blue에 5분간 처리하였다.

간조직내 지방 관찰을 위하여 필요한 냉동절편은 고정된 간조직을 10% formol-calcium에 1주일 동안 oxidation 처리하였다. Cryo-protection를 위해 30% sucrose 용액에 처리된 조직을 O.C.T. compound (Fisher, USA)에 포매한 후 냉동절편기 (Microm, Germany)를 이용하여 10 µm 두께의 냉동절편으로 제작하였다. 냉동절편을 Oil red O 염색을 한 후 지방분포 차이를 비교하였다.

### 6. 면역조직화학

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ 항체를 이용한 면역조직적 염색을 실시하여 지방대사 변화를 관찰하였다. phospho-IκB (p-IκB)항체를 이용한 면역조직적 염색을 실시하여 지방간에 따른 염증 변화를 관찰하였다. phospho-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK)항체를 이용한 면역조직적 염색을 실시하여 지방화에 따른 인슐린 저항성 변화를 관찰하였다. 간조직을 proteinase K (20 µg/mL)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에 4시간 동안 실온에서 반응시켰다. 1차 항체인 mouse anti-PPAR-γ (1:50, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-p-IκB (1:250, Santa Cruz Biotech), mouse anti-p-JNK (1:50, Santa Cruz Biotech)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:100, Abcam)에 4 °C humidified chamber에서 48시간 동안 반응 하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)를 이용하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

7. 영상 분석

면역조직화학의 결과는 image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 사용하여 수치화 (means ± standard error) 되었다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 간 조직을 ×100 배율에서 촬영한 다음 positive pixels /20,000,000 pixels로 영상 분석하였다.

8. 통계

통계는 SPSS software (SPSS 23, SPSS Inc., USA)를 사용하였으며, one-way ANOVA 를 통해 유의성 (p <0.05)을 검증하고 Tukey HSD로 사후 검증하였다.

결 과

1. 체중 조절

16주 동안 고지방식이가 섭취된 HFF (71%)와 GJT (69%)은 Ctrl에 비해 큰 체중 증가를 보였다. 8주간의 치자 추출물 투여는 체중 증가를 둔화시켰는데, 24주 동안 고지방식에만 섭취한 HFF의 체중이 Ctrl에 비해 99%의 증가를 보인 반면, GJT는 HFF보다는 낮은 증가(53%)를 보였다(Table 1).

Table 1. Effects of Gardenia jasminoides (GJ) on body weight in high fat diet feeding mice

GROUP	Body Weight (g)		
	0 week	16th week	24th week
Ctrl	20.5±0.34	28.8±0.53	34.1±0.53
HFF	20.3±0.43	49.2±1.02	68.0±0.67
GJT	20.7±0.30	48.8±0.77	52.3±0.70*

Abbreviation : Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; GJT, High fat diet feeding C57BL/6 with Gardenia jasminoides (14 mg/kg/day) extract for 8 week; \*, p <0.05 compared with HFF

2. Total cholesterol 및 Glucose 변화

Total cholesterol은 Ctrl (176±4 mg/dL)에 비해 HFF (655±16 mg/dL)은 272% 높게 측정되었고. GJT (419±10 mg/dL)은 HFF에 비해 유의성 있는 감소 (36%)를 보였다(Fig. 1).

Glucose은 Ctrl (164±4 mg/dL)에 비해 HFF (372±9 mg/dL)은 127% 높게 측정되었고, GJT (246±7 mg/dL)은 HFF에 비해 34% 적었다(Fig. 1).

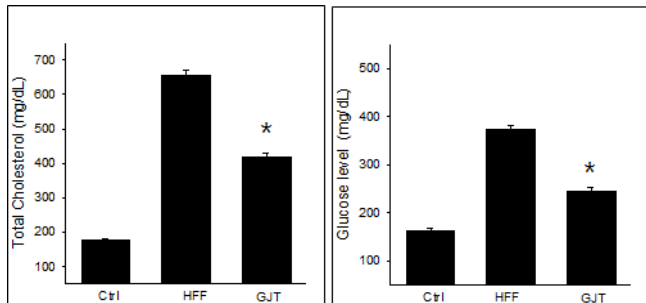


Fig. 1. The mitigative effects of extract of Gardenia jasminoides (GJ) in total cholesterol and glucose level of mice with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Abbreviation : Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; GJT, High fat diet feeding C57BL/6 with GJ (14 mg/kg/day) extract for 8 week; \*, p <0.05 compared with HFF.

3. DXA-Fat

DXA로 체내 지방비율을 분석한 결과, Ctrl (27±0.4%)에 비해 HFF (55±1%)은 104% 높게 측정되었고, GJT (43±1%)은 HFF에 비해 21% 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 2).

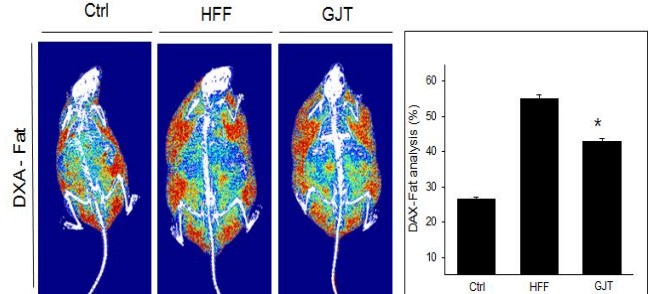


Fig. 2. The mitigative effects of GJ in fat distribution of mice with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Abbreviation : Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; GJT, High fat diet feeding C57BL/6 with GJ (14 mg/kg/day) extract for 8 week; \*, p <0.05 compared with HFF.

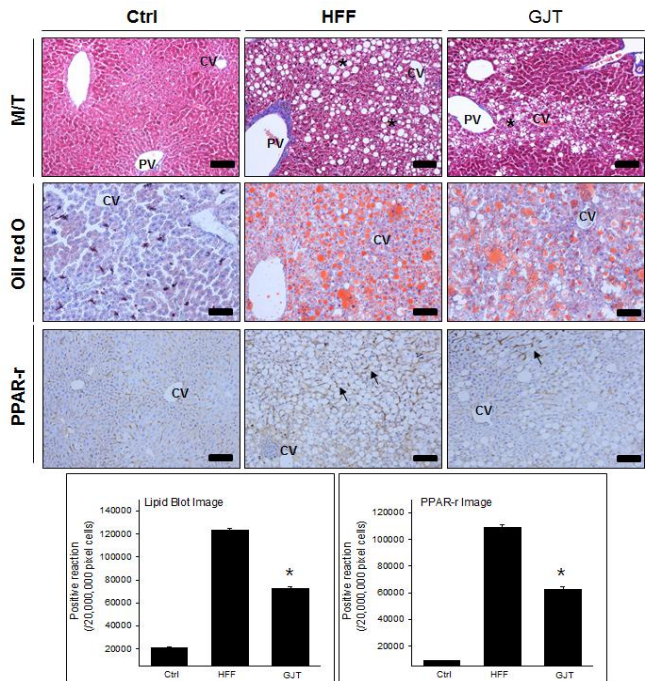


Fig. 3. The mitigative effects of GJ in lipid deposition of mice with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Abbreviation : Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; GJT, High fat diet feeding C57BL/6 with GJ (14 mg/kg/day) extract for 8 week; M/T, Masson trichrome; PPAR-γ, Peroxisome proliferator-activated receptor γ; CV, central vein; PV, portal vein; asterisk, aggregation of hepatocyte with lipid deposition; arrow, PPAR-γ, positive reaction; Bar size, 50µm; \*, p <0.05 compared with HFF.

4. 지방방울 분포변화

HFF는 지방방울이 가득 찬 그물모양(mesh-like type)의 세포질을 가진 지방축적간세포들과 큰 지방방울 덩어리가 세포질에 찬 지방축적간세포들이 간조직에서 다수 관찰되었다. GJT에서는 HFF와 비교하여 더 적은 수의 지방축적 간세포가 관찰되었으며, 중심

정맥 (central vein)과 문맥 (portal vein)의 사이 중간에서만 관찰되었다(Fig. 3).

HFF의 간조직에서는 간세포에서 선분홍색으로 진하게 염색된 다양한 크기의 지방방울을 포함하고 있는 것이 다수 관찰된 반면, GJT는 열게 염색된 작은 지방방울이 축적된 간세포가 관찰되었고, 관찰 지역은 중심정맥과 문맥사이였다. Ctrl (21036 ± 864 /20,000,000 pixel)에 비해 HFF (122,949 ± 2,036 /20,000,000 pixel)은 지방방울이 484% 증가되었다. GJT (72,646 ± 1,808 /20,000,000 pixel)은 HFF에 비해 41% 적었다(Fig. 3).

PPAR-γ 양성반응은 지방축적간세포의 핵과 핵막에서 강한 양성으로 관찰되었다. HFF의 간조직에서는 PPAR-γ 양성반응 (108,678 ± 2,432 /20,000,000 pixel)이 Ctrl (9,123 ± 317 /20,000,000 pixel)에 비해 1,091% 증가하였다. GJT (62,644 ± 1,778 /20,000,000 pixel)은 HFF보다 42% 적었다(Fig. 3).

5. 항염증효과

p-IκB 양성반응은 중심정맥과 문맥주변에 분포하는 그물모양 세포질을 가진 지방축적간세포의 핵과 핵막에서 강한 양성으로 나타났다. HFF의 간조직에서는 p-IκB 양성반응 (76,574 ± 2,313 /20,000,000 pixel)이 Ctrl (6,822 ± 274 /20,000,000 pixel)에 비해 1,022% 증가하였다. GJT (50,060 ± 1,683 /20,000,000 pixel)은 HFF보다 35% 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

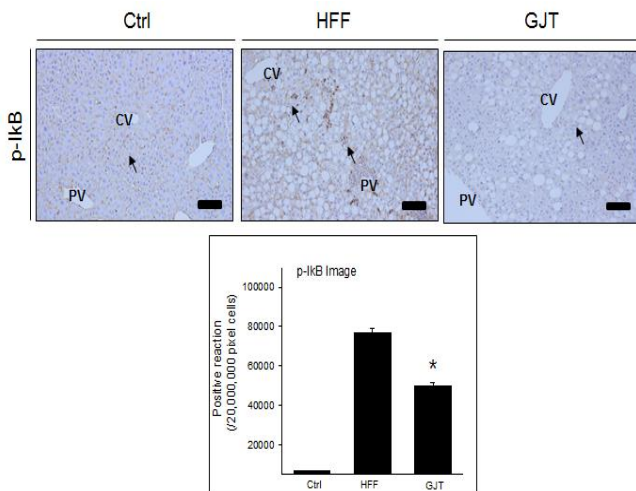


Fig. 4. The decrease of inflammation (p-IκB immunohistochemistry) in hepatic tissue of mice with NAFLD by GJ. Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; GJT, High fat diet feeding C57BL/6 with GJ (14 mg/kg/day) extract for 8 week; p-IκB, phospho-IκB; arrow, immunohistochemistry positive reaction; \*, p <0.05 compared with HFF.

6. 인슐린저항성 조절

p-JNK 양성반응은 중심정맥과 문맥사이에 분포하는 지방축적 간세포들의 세포질에서 강한 양성으로 관찰되었다. HFF의 간조직에서는 p-JNK 양성반응 (78,577 ± 2,432 /20,000,000 pixel)이 Ctrl (8,754 ± 318 /20,000,000 pixel)에 비해 798% 증가하였다. GJT (42,908 ± 1,722 /20,000,000 pixel)은 HFF보다 45% 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5).

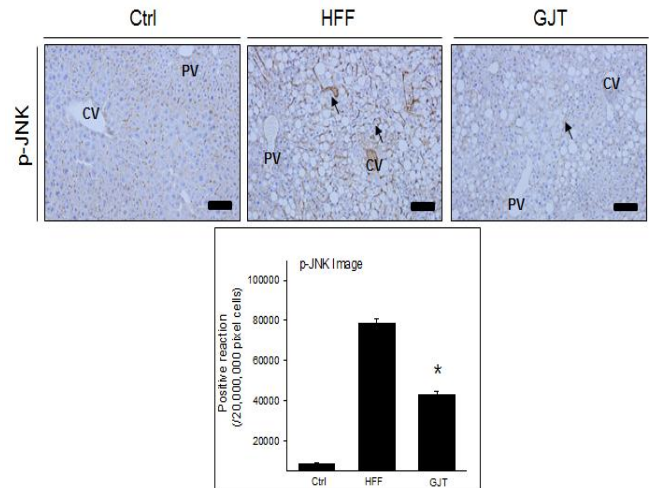


Fig. 5. The Alleviation of insulin resistance in hepatic tissue of mice with NAFLD by GJ (p-JNK immunohistochemistry). Abbreviation : Ctrl, General diet feeding C57BL/6 mice; HFF, High fat diet feeding C57BL/6 mice; GJT, High fat diet feeding C57BL/6 with GJ (14 mg/kg/day) extract for 8 week; p-JNK, phospho-c-Jun N-terminal kinase; arrow, p-JNK positive reaction; \*, p <0.05 compared with HFF.

고찰

NAFLD의 유병률은 전세계에서 지속적으로 증가하고 있으며, 국내에서도 최근 증가 추세에 있다. 이러한 유병률 증가는 비만의 증가와 밀접한 관련이 있다<sup>20</sup>. 최근에는 NAFLD가 인슐린저항성에 근거한 고혈압, 지질대사이상, 비만, 당뇨병과 같은 대사증후군의 일부로 인식되고 있다. NAFLD 환자의 대부분은 유의미한 섬유화가 보이지 않는 단순 지방간 환자로 임상경과가 비교적 양호하다<sup>21</sup>. 하지만 NAFLD 환자 중에서 약 10~20%는 NASH가 발생하며 이 NASH 환자 중 약 9~25% 정도가 간경변증으로 진행된다고 보고되고 있다<sup>22-24</sup>. 간경변증으로 진행된다면 간세포 암의 발병 가능성이 현저하게 증가하게 되며, 10년 이상 경과하면 이 중 30~40%는 간질환의 합병증으로 사망하게 된다.

한의학에서 肝主疏泄이라 하여 간은 인체의 기혈을 소통시키며, 이런 기능이 저하되면 습담이 축적되어 비만 및 지방간을 유발하게 된다고 인식하였다. 특히 肝腎同源이라 하여 肝의 기운이 울체되어 火를 생성하면 腎의 眞陰이 말라서 消渴, 즉 당뇨나 황달이 잘 유발된다고 하여 당뇨와 지방간의 연관성을 제시하고 있다<sup>25</sup>. 이러한 이론에 근거하여 간에 습담이 쌓이면 습열이 생겨 질병이 발병하기에 한의학적 치료법 중 하나인 淸熱利濕法이 지방간 및 인슐린저항성을 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

치자는 이러한 淸熱利濕法의 대표적인 약재 중 하나이다. 본 연구에서는 이러한 치자의 지방대사조절을 통하여 NAFLD로 유도된 인슐린저항성에 대한 개선효과를 알아보려고 하였다.

비만과 인슐린저항성이 있으면 간으로 유리지방산 유입이 증가하고, 유리지방산은 에스테르화를 통해 간 내에 중성지방으로 축적되게 된다. 지방축적으로 PPAR-γ의 발현이 증가하고, 지방산 합성 효소인 Acetyl CoA carboxylase-1 (ACC)와 Fatty acid synthase (FAS) 발현이 촉진되어, 간에서 지방산 합성을 위한 Glucose의 Acetyl-CoA로의 전환이 증가하고 간 내 지방축적이 더

빨라진다<sup>26)</sup>. 과도한 유리지방산으로 인한 산화스트레스와 염증 신호전달체계 활성화에 의해 간 손상이 일어나고 이에 대한 보호기전으로 간 내 TG가 축적된다<sup>27,28)</sup>. 이러한 간세포 사멸과 불충분한 복구는 궁극적으로 간섬유화와 질병 진행을 유발한다<sup>29)</sup>.

본 연구에서는 먼저 치자 추출물이 체중을 조절하여 비만을 억제시킬 수 있는지 확인하고자 체중을 측정하여 비교하였다. 12주 동안 고지방식이 섭취된 HFF, GJT에서 정상식을 섭취한 Ctrl보다 큰 체중 증가를 보였으나, 이후 8주 동안 치자 추출물을 같이 투여한 GJT는 HFF에 비해 체중 증가가 급격하게 둔화되었다. 이는 치자 추출물이 실제로 비만한 상태에서 체중의 급격한 증가를 완화시킬 수 있을 가능성을 보여준다.

이를 확인하고자 본 연구에서는 지방축적 간세포들을 관찰하였다. HFF의 간 조직에서는 지방방울이 가득 차서 그물모양 세포질을 형성한 지방축적 간세포들과 세포질에 큰 지방방울 덩어리가 찬 지방축적 간세포들이 많았다. 반면에 치자 추출물이 8주 동안 투여된 GJT에서는 HFF에 비해 적은 수의 지방축적 간세포가 중심정맥과 문맥의 사이에서 관찰되었다.

또한 Oil red O 염색을 통해 관찰한 간 조직 내 지방방울의 분포변화는 HFF에서는 선홍색으로 진하게 염색된 다양한 크기의 지방방울을 포함하고 있는 간세포가 다수 관찰되었으나, GJT는 열게 염색된 작은 지방방울이 축적된 간세포가 관찰되었다. Ctrl에 비해 HFF는 지방방울이 높게 증가하였으나, GJT는 HFF에 비해 감소되었다.

지방대사에 관여하는 PPAR- $\gamma$  발현은 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰하였으며, PPAR- $\gamma$  양성반응은 지방축적간세포의 핵과 핵막에서 강한 양성으로 나타났다. HFF의 간 조직에서는 PPAR- $\gamma$  양성반응이 Ctrl에 비해 높게 증가하였다. 이에 비해 치자 추출물 투여는 PPAR- $\gamma$  양성반응을 감소시켰는데, GJT는 HFF보다 42% 감소되었다.

이러한 내용은 혈청 total cholesterol 수치를 통하여 다시 확인할 수 있었다. 혈청 total cholesterol은 Ctrl에 비해 HFF는 높았으나, 이에 반해 GJT는 HFF에 비해 36% 감소되었다.

이러한 조직학적, 면역조직학적 결과와 혈액학적 결과는 치자 추출물이 간 조직 내에서 지방대사조절에 관여하고 있음을 분명하게 보여주고 있다.

지방축적이 간에서 과도하게 진행되면 지방대사조절에 문제가 생기고 이와 함께 염증이 발생한다. 이는 단순한 지방축적 소견만 보이는 단순 지방간에서 염증소견이 동반된 지방간염으로의 이행을 의미하며, 지방축적과 함께 약해진 간세포에 이차 타격이 가해져서 나타난다<sup>30)</sup>. 염증질환에서 비만세포와 대식세포가 자극을 받으면 nitric oxide, nuclear factor (NF)- $\kappa$ B 같은 물질을 분비한다. 염증반응은 inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)의 인산화 (phosphorylation)가 증가하여 NF- $\kappa$ B의 핵 안으로 전좌 (translocation)하여 target 유전자의 NF- $\kappa$ B binding site에 결합함으로써 염증관련 유전자 발현을 유도한다<sup>31)</sup>. NF- $\kappa$ B는 염증 반응에 주요한 전사인자로, 혈관 투과성을 증가시키고 부종 등의 염증반응을 촉진시킨다<sup>32,33)</sup>.

본 연구에서는 NF- $\kappa$ B의 활성조절을 확인하고자 p-I $\kappa$ B 양성반응을 조사하였다. p-I $\kappa$ B 양성반응은 중심정맥과 문맥주변에 분포하

는 그물모양 세포질을 가진 지방축적 간세포의 핵과 핵막에서 강한 양성으로 관찰되었다. HFF에서는 p-I $\kappa$ B 양성반응이 Ctrl에 비해 높게 증가하였다. 이에 비해 치자 추출물 투여는 p-I $\kappa$ B 양성반응을 감소시켰는데, GJT는 HFF보다 35% 감소하였다.

이러한 결과는 치자 추출물이 간에서 지방이 과도하게 축적되어 지방간염으로 진행되는 것을 완화 혹은 감소시킬 수 있음을 의미한다. 간 내 지방축적이 높은 상태에서 고지방섭취가 지속적으로 진행되면 지방에 의한 산화적 스트레스를 높이고 지방간염으로의 이행 가능성을 증가시킨다. 본 연구결과를 통해 치자 추출물이 이러한 가능성을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

지방에 의한 산화적 스트레스 증가는 염증 및 순환 장애를 유발하며, 지방간에 의한 인슐린저항성 증가는 고인슐린증 및 내당장애 일으킨다. 임상적으로 당뇨병, 비만, 고혈압, 고지혈증 등과 같은 대사증후군이 NAFLD와 연관성 있다. 대사증후군은 일반적으로 인슐린저항성을 동반하는 것이 특징적 증상이며, NAFLD 역시 대부분 인슐린저항성이 증가되어 있다<sup>30)</sup>. 이러한 이유로 최근들어 NAFLD 치료에 대한 중요성이 점차 높아지고 있다.

인슐린저항성은 2형 당뇨병에서 중요한 선형요인인 동시에 대사증후군 발생의 핵심인자이므로 인슐린저항성 발생기전을 명확히 인식하고 그러한 기전에 근거한 치료가 필수적이다. 기존 인슐린저항성 치료제인 Metformin은 당뇨 진단을 받은 이후에 사용되며 위장관 계통의 부작용을 유발하고 간 기능 장애가 있으면 사용이 불가능하다<sup>8)</sup>. Thiazolidinedione은 부작용으로 간 손상이 보고되어 치료제로서의 사용이 극히 제한적이다. 현재까지 개발된 치료약들의 대부분이 부작용을 가지고 있어 제한적이며, 인슐린저항성 발생기전을 통해 NAFLD를 예방하는 목적으로 사용이 불가능하다<sup>34,35)</sup>.

본 연구에서 보면 인슐린저항성에 관여하는 p-JNK의 양성반응은 중심정맥과 문맥사이에 분포하는 큰 지방방울 덩어리가 세포질에 찬 지방축적 간세포들의 세포질에서 관찰되었다. HFF에서는 p-JNK 양성반응이 Ctrl에 비해 증가하였다. 이에 비해 GJT는 HFF보다 45% 감소되었다.

본 연구에서는 이러한 인슐린저항성 조절 효과를 보다 정확하게 확인하고자 glucose 수치를 측정하였다. glucose은 Ctrl과 비교하여 HFF, GJT 모두 증가하였으나, GJT는 HFF에 비해 34% 적게 증가하였다. 이러한 면역조직학적 결과와 혈액학적 결과들은 치자 추출물이 인슐린저항성 조절 효과가 있음을 의미한다.

치자의 생리활성물질인 genipin은 미토콘드리아 기능을 조절함으로써 췌장의 인슐린 분비를 자극하는 것으로 보고되고 있다. genipin은 포도당 소비 및 글리코겐 합성을 촉진함으로써 인슐린 감수성을 개선하고, 세포 ROS 과잉 생산을 억제하고, 산화 스트레스 관련 JNK 활성화를 역전시킨다<sup>36)</sup>. 이러한 연구결과는 치자가 인슐린저항성 개선 효과가 있음을 말하고 있으나 대부분이 in vitro 위주의 결과인 반면에, 본 연구는 이러한 치자의 인슐린저항성 개선 효과를 동물실험을 통하여 조직화학적 방법과 면역조직화학적 방법으로 보다 뚜렷하게 제시하고 있다. 또한 본 연구에서는 혈액학적 지표를 통하여 연구결과의 객관성을 뒷받침하고 있다.

본 연구는 치자 추출물이 지방대사를 조절함으로써 비알콜성 지방간증을 완화시키는 효과와 비알콜성 지방간으로 인하여 유도된



인슐린저항성을 개선시키는 효과가 있음을 확인하였다. 오늘날 부작용이 있음에도 불구하고 Metformin이 인슐린저항성 당뇨병치료제로 널리 사용되고 있다. 향후 후속연구로 Metformin과의 비교 연구를 통해 치자 추출물의 인슐린저항성 조절 효과 정도에 대한 확인이 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

치자 추출물의 지방대사조절을 통한 비알콜성 지방간 유도 인슐린저항성 개선 효과를 확인하기 위해 본 연구는 태령 8주의 수컷 생쥐에 고지방식이를 섭식시킨 후 치자 추출물을 투여하여 생쥐의 체중변화, Total cholesterol 및 Glucose 변화, 지방방울 분포, PPAR- $\gamma$  양성반응, 항염증작용, 인슐린저항성 조절을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

체중 측정 결과 치자 추출물 투여한 고지방식이 섭식군이 단순 고지방식이 섭식군에 비해 체중증가가 유의하게 억제되었다.

Total cholesterol 및 Glucose 수치는 치자 추출물 투여군에서 증가가 유의하게 억제되었다.

지방방울 분포 및 PPAR- $\gamma$  양성반응은 치자 추출물 투여군에서 증가가 유의하게 억제되었다.

간조직의 p-IkB 양성반응은 치자 추출물 투여군에서 증가가 유의하게 억제되었다.

간조직의 p-JNK 양성반응은 치자 추출물 투여군에서 증가가 유의하게 억제되었다.

## 감사의 글

이 논문은 2018학년도 세명대학교 연구년 지원에 의해 수행된 연구임.

## References

- Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol* 2006;40 Suppl 1:S5-10.
- Korea Food & Drug Administration. The press release. Retrieved Nov. 14, 2013. Available from <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=675&seq=19618&cmd=v>
- Oh K, Jang MJ, Lee NY, Moon JS, Lee CG, Yoo MH. Prevalence and trends in obesity among Korean children and adolescents in 1997 and 2005. *Korean J Pediatr*. 2008;51:950-5.
- Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28:155-61.
- Barshop NJ, Sirlin CB, Schwimmer JB, Lavine JE. Review article epidemiology, pathogenesis and potential treatments of paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28:13-24.
- Ahn YJ, Yoon KH, Jo JH, Jang DH, Jung YS, Kim JH, Kim BC, Seok HJ, Yoo JS, Ku JR, Yoon M, Shin SS. Gangjihwan Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High Fat Diet-Fed C57BL/6N Mice. *Kor. J. Herbology* 2014;29(2):47-54.
- Lee BW. Management of Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Lifestyle Modification. *Korean Diabetes*. 2018;19:82-7.
- Cone CJ, Bachyrycz AM, Murata GH. Hepatotoxicity associated with metformin therapy in treatment of type 2 diabetes mellitus with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Pharmacother*. 2010;44(10):1655-9.
- Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet*. 2001;27:121-4.
- Xu J, Lee WN, Phan J, Saad MF, Reue K, Kurland IJ. Lipin deficiency impairs diurnal metabolic fuel switching. *Diabetes*. 2006;55(12):3429-38.
- Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Miles LM, Phanavanh B, Starks TN, Phan J, Spencer HJ 3rd, McGehee RE Jr, Reue K, Kern PA. Lipin expression is attenuated in adipose tissue of insulin-resistant human subjects and increases with peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Diabetes*. 2006;55(10):2811-8.
- Jeong HS, Lee YS, Won JH, Hwang JT, Baek DG. Effect of The Gardenia jasminodes and Glycine max and Chijasi-tang Extract on Acute Liver Damage Induced by Galactosamine in Rats. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2013;34(3):303-14.
- Ko H, Kim KT, Shin SM. Study on Validity of Using Injinho-tang in Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2012;26(6):823-33.
- Kim K, Ko H, Shin S. Diagnostic Process Analysis of Prescribing Injinho-tang in Non Alcoholic Fatty Liver Disease Using by AHP. *The Journal of the Society of Korean Medicine Diagnostics*. 2015;19(3):159-71.
- Jang YS, Seo JY, kwun MJ, Kwon JN, Lee I, Hong JW, Kim SY, Choi JY, Park SH, Joo M, Han CW. Effect of Phaseolus angularis Seed on Experimental Cellular Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2013;27(6):802-8.
- Kim SY, Kwon JN, Lee I, Hong JW, Choi JY, Park SH, Kwon MJ, Joo M, Han CW. Research on Anti-lipogenic Effect and Underlying Mechanism of Laminaria japonica

- on Experimental Cellular Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Int. Korean Med.* 2014;35(2):175-83.
17. Jung YS, Kim JH, Kim BC, Seok HJ, Yoo JS, Ku JR, Yoon KH, Jo JH, Jang DH, Yun HY, Yoon M, Shin SS. Comparison of Gangjihwan-1,2,3,4 and Combination of Gangjihwan-1 and Gamisochehwan in the Improvement Effects of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a High Fat Diet-Fed Obese Mouse Model. *Kor. J. Herbology.* 2014;29(6):149-56.
  18. Han CW, Lee JH. Effects of KHchunggan-tang on the Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Palmitate-induced Cellular Model. *J Korean Oriental Med.* 2011;32(1):109-20.
  19. Akbar DH, Kawther AH. Nonalcoholic fatty liver disease in Saudi type 2 diabetic subjects attending a medical outpatient clinic: prevalence and general characteristics. *Diabetes Care.* 2003;26:3351-2.
  20. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40:1387-95.
  21. Day CP. Natural history of NAFLD: remarkably benign in the absence of cirrhosis. *Gastroenterology.* 2005;129:375-8.
  22. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology.* 2006;44:865-73.
  23. Fassio E, 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.
  24. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129:113-24.
  25. Son CK. The research of immunological function in liver. *J Korean Oriental Med.* 2001;22(1):3-9.
  26. Park MJ, Kim DI, Lim SK, Choi JH, Kim JC, Yoon KC, Lee JB, Lee JH, Han HJ, Choi IP, Kim HC, Park SH. Thioredoxin-interacting protein mediates hepatic lipogenesis and inflammation via PRMT1 and PGC-1 $\alpha$  regulation in vitro and in vivo. *Journal of Hepatology.* 2014;61:1151-7.
  27. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2007;45:1366-74.
  28. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* 2004;40:185-94.
  29. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2008;28:370-9.
  30. Kim TH. Obesity and fatty liver disease. *Korean Journal of Medicine.* 2005;68(4):347-50.
  31. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B - Ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
  32. Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 2003;17(14):2115-7.
  33. Cha HY, Ahn SH, Cheon JH, Park IS, Kim JT, Kim KB. Hataedock treatment has preventive therapeutic effects in atopic dermatitis-induced NC/Nga mice under high-fat diet conditions. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016:1-13.
  34. Lipscombe LL, Gomes T, Lévesque LE, Hux JE, Juurlink DN, Alter DA. Thiazolidinediones and cardiovascular outcomes in older patients with diabetes. *JAMA* 2007;298:2634-43.
  35. Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2007;298:1180-8.
  36. Lili G, Haiyan F, Dezheng G, Xu Z, Li C, Qiong W, Bo Y, Mei Y, Jie Z, Yuan Z. Genipin ameliorates age-related insulin resistance through inhibiting hepatic oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Experimental Gerontology.* 2013;48(12):1387-94.