

Silymarin과 작약감초탕 병용투여의 C57BL/6 마우스 간조직 지질축적 및 염증 억제효과

최정원^{1#}, 조수정^{2#}, 신미래¹, 박해진^{3*}

1 : 대구한의대학교 한의학과 본초학교실, 2 : (재)경북지역사업평가단
3 : 대구한의대학교 바이오융복합시험센터

Combined Treatment of Silymarin and Jakyakgamcho-tang Suppresses Hepatic Lipid Accumulation and Inflammation in C57BL/6 Mice

Jeong Won Choi^{1#}, Su-Jung Cho^{2#}, Mi-rae Shin¹, Hae-Jin Park^{3*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation
3 : DHU Bio Convergence Testing Center, Daegu Hanny University Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : The aim of the present study is to examine hepatic lipid-lowering and anti-inflammatory effects of silymarin combined with Jakyakgamcho-tang on non-alcoholic fatty liver disease in a high fat diet-induced obese mice model.

Methods : C57BL/6 mice were divided into four dietary groups: (1) Normal, (2) Control (60% high-fat diet), (3) Control + silymarin 50 mg/kg/day (Silymarin), (4) Control + Silymarin 50 mg/kg/day + Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day (SPG). After 12 weeks administration, mice were sacrificed and lipids and inflammation-related biomarkers were analyzed liver and plasma.

Results : Silymarin and SPG treatments significantly lowered body and liver weights compared to the Control. Serum lipids (triglyceride (TG), total cholesterol) and pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 β , and IL-6) concentrations were significantly lowered in the Silymarin and SPG groups than the Control group. Silymarin and SPG treatments suppressed hepatic TG level and hepatic lipid droplets compared to the Control. These two treatments significantly increased hepatic kinase B1 and AMP-activated protein kinase protein levels, and significantly decreased hepatic key lipogenic enzymes (acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase and stearyl coenzyme A desaturase 1) protein levels than the Control. SPG also significantly increased hepatic fatty acid oxidation-related protein (peroxisome proliferator-activated receptor alpha and uncoupling protein 2) levels than the Control.

Conclusions: Silymarin and SPG suppressed hepatic lipid accumulation by regulating hepatic protein expression, and lowered blood pro-inflammatory cytokines concentrations though the synergic effect of silymarin and Jakyakgamcho-tang was not clear.

Key words : silymarin, Jakyakgamcho-tang, hepatic lipid accumulation, inflammation, C57BL/6 mice

*Corresponding author : Hae-Jin Park, Bio Convergence Testing Center., Daegu Haany University, Gyeongbuk, Gyeongsan 38578, Korea.
· Tel : +82-53-819-7876 · Fax : +82-53-819-1496 · E-mail : hjpark@dhu.ac.kr

#First author : Jeong Won Choi, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongbuk, Gyeongsan 38578, Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : purpne@nate.com

Su-Jung Cho, Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation, Gyeongbuk, 27 Sampoong-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712210, Korea

· Tel : +82-53-819-7876 · Fax : +82-53-819-1496 · E-mail : chosj1181@naver.com

· Received : 01 July 2022

· Revised : 02 September 2022

· Accepted : 25 September 2022

I. 서론

비알콜성지방간 (non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD))은 전세계적으로 발생하고 있는 주요한 간질환으로 알코올섭취나 약물 복용 및 동반된 다른 원인에 의한 간질환이 없으면서 간내 지방이침착되는 질환으로 비알콜성지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 비알콜성 지방간 연관 간경변증을 포함한다¹⁾. 국내 국민건강영양조사 자료를 분석한 연구에 따르면 비알콜성지방간의 유병률은 전기 (1998-2001년) 18.6%에서 후기 (2016-2017년) 21.5%로 증가되었고²⁾, 연관된 질병으로 비만, 당뇨, 대사증후군 등이 있으며 염증, 산화적 스트레스, 지질대사이상 등에 영향을 준다고 밝혀져 있다^{2,3)}. 현재까지 FDA(Food and Drug Administration)에서 승인한 NAFLD의 치료제는 없으며, 단지 비만, 인슐린저항성, 대사증후군, 이상지질혈증 등을 개선시키는 치료에 집중하고 있는 실정이다¹⁾.

간 보호 효과로 잘 알려져 있는 silymarin의 경우 밀크씨슬 (*Silybum marianum* L. Gaertn.)의 열매 및 씨앗으로부터 추출된 flavanolignan으로 인슐린 저항성 감소, 혈압 및 지질 대사 조절, 항산화 및 항염증 등의 효능이 보고되어 있다.²⁾ 뿐만 아니라, NAFLD 유발마우스 모델에서 silymarin 투여는 지질대사 및 산화적스트레스 개선과 혈액 및 mRNA 유전자 발현 조절을 통하여 지방간을 완화시켰다고 보고된 바 있다⁴⁾.

작약(芍藥, *Paeonia lactiflora* Pallas)은 미나리아재비과에 속하는 다년생 초본인 참작약, 산작약의 뿌리로서 구근을 약재로 사용하며 진통, 진해, 부인병, 고혈압 및 염증 치료제로 널리 이용해왔다⁵⁾. 작약뿌리로부터 얻은 다양한 용매 추출물이 고콜레스테롤 식이로 증가한 혈중 콜레스테롤을 저하시킴으로써 고지혈증 억제효능을 나타낸다고 보고된 바 있으며⁶⁾, Lee 등⁷⁾은 간에서 Nrf2 활성화를 통하여 산화적 스트레스를 억제하고, 미토콘드리아를 보호한다고 보고하였다.

감초(甘草, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch)는 뿌리와 뿌리 줄기를 건조하여 한방처방전에 사용되는 대표적인 생약으로 조화제약(調和諸藥)이라 하여 협조적 방식을 통하여 처방 중의 약물 배율을 강화시켜 약효를 강화하는 소재로⁸⁾, 여러 연구논문에서 감초는 단독 또는 한약재 복합물로서 포함되어 고지혈증, 항산화, 항염증 및 간보호 작용 등의 효능이 보고된 바 있다⁹⁾. 작약과 감초, 두 개의 약재로 구성된 작약감초탕 (芍藥甘草湯, *Jakyakgamcho-tang*, *Shaoyaogancao-Tang* in Chinese)의 경우 복통 치료제로 복용 되고 있으며 그 외 항염증, 항불안, 근육 피로 및 통증 개선 효과 등이 보고되었다¹⁰⁾. 종합하면, silymarin 과 작약 및 감초는 NAFLD에서 간보호 및 간기능 개선 효능으로 간 해독작용, 간 피로 개선 및 운동능력 향상과 관련된 것으로 파악되었고, 각 약물의 효능평가에서 지질대사 개선효과를 보고하고 있었다. 그러나 이들을 병용투여하여 NAFLD의 대표병증인 지질대사 개선에 대한 연구를 보고한 적은 없었다. 따라서 본 연구에서는 silymarin과 작약 감초탕이 고지방식이로 야기된 이상지질대사를 개선하고, 그에 따른 항염증에 미치는 영향을 알아보고자 간조직지질 및 관련 단백질 발현도와 혈중 바이오마커 변화 분석을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에서 사용한 작약감초탕의 작약과 감초는 용기한약국 (Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 대한민국약전외한약(생약)규격집(식품의약품안전처고시 제2022-17호)의 한약재 관능검사 해설서 기준으로 규격에 적합한 것을 선정하여 사용하였다. 작약과 감초를 1:2의 비율로 2시간 동안 열수 추출하여 얻어진 추출물을 회전 감압농축기 (Buchi B-480, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)로 농축한 후, 동결 건조기 (FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System, LABCONCO, MO, USA)로 완전 건조시켜 파우더 (증류수 1L, 수율; 17.78%)를 얻었다.

2. 시약

Potassium persulfate, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)는 Sigma Aldrich (St Luis, MO, USA)에서, BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)에서 구입하였으며, protease inhibitor mixture solution과 EDTA는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였다. ECL Western Blotting Detection Reagents 및 pure nitrocellulose membranes는 GE Healthcare (Chicago, IL, USA)에서 구입하였다. 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)로부터 liver kinase B1 (LKB1), phosphorylated-LKB1 (p-LKB1), AMP-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated-AMP-activated protein kinase (p-AMPK), acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), stearyl coenzyme A desaturase 1 (SCD-1), peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), uncoupling protein 2 (UCP-2), carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1), β -actin을 구입해 사용하였으며, 2차 항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, LA, USA)로부터 구입하였다.

3. 폴리페놀 함량 분석

작약감초탕의 총 폴리페놀 함량은 Folin Ciocalteu's의 방법을 이용하여 구하였다. 7.5% sodium carbonate 400 μ L, 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L 및 시료 100 μ L를 혼합하여 실온의 암소 환경에서 30분간 반응시킨 다음 Microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Mannedorf, Switzerland) (765 nm)로 흡광도를 측정하였다. 본 실험에서 표준 물질로 사용한 gallic acid로 표준 검량선을 구했으며, 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다 (mg gallic acid equivalents (GAE)/g).

작약감초탕의 총 플라보노이드 함량은 aluminum chloride를 사용한 비색법을 사용하여 측정하였다. 1 M potassium acetate solution 20 μ L, methanol 300 μ L, 증류수 560 μ L, 10% aluminium chloride solution 20 μ L 및 100 μ L 시료를

혼합하여 실온의 압소 환경에서 30분간 반응시킨 다음 Microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Mannedorf, Switzerland) (415 nm)로 흡광도를 측정하였다. 본 실험에서 표준 물질로 사용한 quercetin으로 표준 검량선을 구했으며, 작약감초탕의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다 (mg quercetin equivalents (QE)/g).

4. 시료의 항산화활성 분석

DPPH 자유라디칼 소거능 분석은 DPPH 자유라디칼 소거법을 참고하였다¹¹⁾. DPPH 60 μ M 용액 100 μ L와 농도별 작약감초탕 100 μ L를 반응시켜 microplate reader (Infinite M200 PRO, Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 활용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 L-ascorbic acid로 계산식은 아래와 같다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ & = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}})] \times 100 \\ & \text{OD}_{\text{sample}}: \text{Absorbance of sample,} \\ & \text{OD}_{\text{control}}: \text{Absorbance without sample} \end{aligned}$$

ABTS 자유라디칼 소거능은 ABTS 자유라디칼 소거법을 이용하였다¹²⁾. 2.4 mM potassium persulfate, 7 mM ABTS를 혼합해 압소에 16시간 경과 후 ABTS⁺을 형성시켜 흡광도 415 nm에서 0.70 \pm 0.02 측정값이 되도록 에탄올로 희석해 사용하였다. ABTS 희석용액 95 μ L에 작약감초탕 5 μ L를 가하여 15분 후 microplate reader (Tecan)를 이용해 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 양성대조군으로 아래와 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ & = [1 - (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}})] \times 100 \\ & \text{OD}_{\text{sample}}: \text{Absorbance of sample,} \\ & \text{OD}_{\text{control}}: \text{Absorbance without sample} \end{aligned}$$

5. 동물사육 실시

C57BL/6 마우스 (4-wk-old, male)(Daehanbio Link., Eumseong, Korea)를 구입하여 물과 고형사료(Samyang Corporation, Seoul, Korea)를 충분히 공급하면서 1주간 실험실 환경에 적응시켜 본 실험에 사용하였다. 동물사육은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))의 승인 (승인번호: DHU2021-084)을 받아 진행하였다. 실험군은 난괴법에 의해 군당 9마리씩 4개군, 즉 정상군 (Normal, 일반식이 (Samyang Corp.)), 대조군 (Control, 60% high-fat diet (HFD, Diet 12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA)), Silymarin군 (control + silymarin 50 mg/kg/day), SPG군 (control + silymarin 50 mg/kg/day + Jakyakgamcho-

tang 100 mg/kg/day)으로 나누어 12주간 사육하였다. 약물은 매일 일정한 시각에 증류수에 녹여 종대 (zonde)로 경구 투여하였다. 마우스의 체중 및 식이섭취량을 매일 일정한 시각에 1일 1회 측정하였으며, 동물실 환경은 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 50 \pm 5%였으며 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 유지하였다. 마우스 부검 전에는 12시간 절식시킨 후 혈액을 채취해 혈청을 분리하였으며 간 및 부고환 백색지방 조직을 적출하였다.

6. 혈액 바이오마커 및 간조직 지질 농도

혈청은 마우스의 심장에서 혈액을 채혈해 4,000 rpm, 10분간 원심분리하여 사용하였다. 혈청 triglyceride (TG) 및 total cholesterol (TC)은 농도는 TG, TC assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)를 이용해 측정하였다. Alanine aminotransferase (ALT/GPT) 및 aspartate aminotransferase (AST/GOT) 간손상 지표 농도는 assay kit (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)의 프로토콜을 사용해 측정하였다. 혈청 사이토카인 tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6는 multiplex detection kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용해 분석하였다. 간조직 지질은 클로로포름 : 메탄올 (2:1, v/v)액으로 추출하고 TG 및 TC 농도는 혈청과 동일한 방법을 사용하였다¹³⁾.

7. 간 및 지방 조직의 형태학적 관찰

간 및 부고환 백색지방 조직 일부를 포르말린에 고정시키고 파라핀으로 포매하여 4 μ m의 절편을 만들어 사용하였다. 간 및 부고환 백색지방 조직을 hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색해 분석하였다. 간조직 oil red O 염색은 free floating method를 사용하였으며, 간조직 섬유화를 확인하기 위해 Masson's trichrome staining을 진행하였다. 염색 후 광학 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

8. 간조직 western blot 분석

간조직 단백질은 lysis buffer (20 mM Tris, 1 mM Na3vo4, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 mM NaF)로 추출한 후 BCA protein assay reagent kit를 사용해 정량하였다. 단백질 동량을 SDS PAGE gel로 전기영동하였으며 nitrocellulose membrane에 전이시키고 5% skim milk에 1시간 blocking하였다. 1차 항체는 4 $^{\circ}$ C, overnight를 진행했으며 2차 항체는 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. ECL Western blotting detection reagents, Image Quant LAS 4000 Mini Biomolecular Imager (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)로 단백질 발현을 확인하였으며, ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)로 band를 정량하였다.

9. 통계처리

실험결과는 SPSS package (Version 25.0, IBM, Armonk, NY, USA) 통계 프로그램을 사용하였으며 평균 값과 표준오차로 표시하였다. 대조군과 각 실험군들 간 일원배치분산분석을 실시하여 p -value가 0.05 미만일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. 작약감초탕의 polyphenol 함량 및 항산화활성 분석

작약감초탕의 total polyphenol 및 total flavonoid, 항산화 활성을 분석한 결과는 Table 1에 제시하였다. Total polyphenol 및 total flavonoid는 자유라디칼을 제거하여 항산화제로서 역할을 하며 본 연구에서 작약감초탕 열수추출물에서의 함량은 Kim 등 연구¹⁴⁾ (25.49 ± 0.8 , 3.94 ± 0.5)에서 보다 높았으며 ABTS 및 DPPH 활성 역시 본 연구에서 사용한 작약감초탕이 우수 하였다¹⁴⁾.

Table 1. Total Polyphenol Content and Antioxidant Property of Jakyakgamcho-tang

Total polyphenol (mg gallic acid equivalents (GAE)/g)	Total flavonoid (mg naringin equivalents (NE)/g)	DPPH IC50 (μ g/mL)	ABTS IC50 (μ g/mL)
54.01 \pm 0.02	6.12 \pm 0.09	26.51 \pm 0.04	49.05 \pm 0.06

The results are Mean \pm SE from three replication.

2. 체중, 식이효율 및 조직 무게

체중 및 식이효율 분석 결과는 Table 2와 같다. 최종체중 및 체중증가량은 Control군이 Normal군에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 식이섭취량은 Control군이 Normal군에 비해 유의적으로 감소하였으므로, 실험기간 내 성장한 체중 증가량을 같은 기간 동안 섭취한 식이의 양으로 나누는 식이효율의 경우 Control군이 Normal군에 비해 유의적으로 높은 것으로 산출되었다. 고지방식이에 의해 Control군에서

증가한 체중 및 체중증가량은 Silymarin 및 SPG 투여에 의해 유의적으로 감소되었으며, 식이효율 또한 이들 보충투여에 의해 Control군에 비해 유의적으로 감소된 것으로 나타났다. 체중 및 식이효율 감소효과는 Silymarin 단독투여군이 SPG 투여군 보다 효과가 다소 큰 것으로 분석되었으나 시험군간 유의성은 없었다.

Table 2. Body Weight and Food Efficiency Ratio

Group	Initial \uparrow BW (g)	Final BW (g)	BW gain (g)	Food intake (g)	Food efficiency ratio
Normal	20.50 \pm 0.37	27.75 \pm 0.58	7.25 \pm 0.45	2.91 \pm 0.07	2.86 \pm 0.15
Control	20.97 \pm 0.27	42.74 \pm 0.93 ^{###}	21.78 \pm 0.82 ^{###}	2.20 \pm 0.02 ^{###}	11.37 \pm 0.38 ^{###}
Silymarin	20.98 \pm 0.25	36.61 \pm 1.11 ^{***}	15.64 \pm 1.01 ^{***}	2.08 \pm 0.04	8.67 \pm 0.58 ^{**}
SPG	21.07 \pm 0.31	37.81 \pm 1.13 ^{**}	16.74 \pm 1.19 ^{***}	2.14 \pm 0.03	9.03 \pm 0.69 ^{**}

All values are mean \pm SE (n=9). ^{###} $p < 0.001$, compared with Normal group. ^{**} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$, compared with Control group. Control, 60% high-fat diet group; Silymarin, Control with silymarin 50 mg/kg/day group; SPG, Silymarin with Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day group. \uparrow BW, body weight.

사육기간 종료 후 측정된 간 및 부고환 백색지방 무게 결과는 Table 3에 제시하였다. 간 조직 무게는 Silymarin군 및 SPG군에서 Control군에 비해 유의적으로 감소한 것으로 측정되었다. 부고환 백색지방 조직 무게는 Normal군에 비해 Control군에서 유의적으로 높게 측정되었으며 Silymarin 및 SPG 투여군들에서는 유의성은 나타나지 않았으나, 수치는 다소 낮게 측정되었다.

고지방식이유도 비만 마우스에서 silymarin의 보충이 체중^{15,16)} 및 부고환지방 무게 감소 효능이 보고된 바 있으며 본 연구결과와 같이 식이섭취량의 차이는 나타나지 않았다¹⁶⁾. 한

편, 12주간 고지방식이 급여 후 6주간 silymarin을 보충급여한 마우스 연구에서는 체중변화는 나타나지 않았고¹⁷⁾, Silymarin 단독 및 강황 (Bisdemethoxycurcumin) 병용투여 마우스 연구에서는 단독 및 병용투여군 모두 체중 및 간 조직 무게 감소 효능이 나타나¹⁸⁾, 연구 결과와 유사한 결과를 보고하였다.

본 연구에서는 비알콜성지방간을 유도하기 위하여 60% fat을 포함하는 고지방식이를 급여하여 단순 간조직 중량은 증가하였으나, 100g 체중 당 환산한 간조직중량은 정상대조군과 Control 군간 차이가 나타나지 않았다(Table 3). 이는 황금추출물의 지질대사 개선 연구¹⁹⁾에서 고지방식이 유도 마

스의 간 조직 중량이 정상군과 유의적 차이를 나타내지 않은 보고와 일치한다. 또한 60% 고지방식이 섭취군과 정상식이 섭취군간의 간조직 중량 비교 시, 육안상 비대해졌으나 중량은 유의적 차이를 나타내지 않았다고 보고한바 있어²⁰⁾ 본 실험의 결과와 유사하였다. 그러나, 본 실험에서는 고지방식이 급여로 간조직으로의 지질이 다량 유입됨으로써 간조직지질 함량이 Control군에서 정상대조군에 비하여 유의적으로 증가되어 지방간이 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 1). 한편 Silymarin 및 SPG 투여군의 경우 Control 군과 비교하여 간조직 중량 및 지질함량이 감소하였는데, 이는 정상군보다 낮은 수치로 Kim 등²¹⁾ 역시 NAFLD 유도 마우스에서 Silymarin과 한약재 병용투여로 인한 간조직 중량 및 지질함량이 정상군 또는 대조군 대비 감소 현상을 보고하였으며, 이는 시험물질의 간조직 지방축적억제 효과로 해석하고 있다.

Table 3. Organ Weight (g/100 g body weight)

Group	Liver	White adipose tissue
Normal	4.43±0.25	2.25±0.29
Control	4.11±0.24	5.60±0.17###
Silymarin	3.01±0.18**	5.40±0.20
SPG	2.98±0.13**	5.53±0.23

All values are mean±SE (n=9). ### $p < 0.001$, compared with Normal group. ** $p < 0.01$, compared with Control group. Control, 60% high-fat diet group; Silymarin, Control with silymarin 50 mg/kg/day group; SPG, Silymarin with Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day group.

3. 혈청 바이오마커

혈청에서 측정된 지질 농도, 간 손상 및 염증 관련 바이오마커 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 혈청 TC 및 TG 농도는 고지방식이 급여로 인해 Control군에서 Normal군에 비해 유의

적으로 증가된 것으로 나타났고, 증가된 혈청 TC 및 TG 농도는 Silymarin 및 SPG 보충투여로 유의적으로 감소되었다. 간은 효소의 농도가 높고 혈액으로 유출이 쉬운 구조를 가지고 있어 간 손상으로 인한 혈중 효소활성도(AST 및 ALT)를 측정함으로써 간독성을 평가하는데²²⁾, 본 연구에서 혈청 AST 및 ALT 활성도를 측정된 결과 Control군이 정상대조군에 비하여 유의적으로 높게 관찰되었고, 이는 고지방식으로 인한 간세포 독성으로 간 실질세포의 장애로 인하여 혈중으로 효소들의 방출이 항진되어 활성이 증가한 것으로 해석 할 수 있다²³⁾. 고지방식으로 증가되어진 이들 효소 활성은 Silymarin 및 SPG 투여로 저하되었으며, 특히 ALT 활성의 경우 유의적으로 저하되어 이는 Silymarin의 항산화작용으로 인한 간세포보호 및 재생작용, 간 해독능 증가 등 다양한 간보호작용과²⁴⁾ 함께 간조직으로의 지방축적을 억제함으로써(Fig 1) 고지방식에 의한 간 손상을 일부 저하시켜 준 것으로 판단되어진다.

염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 농도는 Control군에서 Normal군에 비해 유의적으로 증가되었고, Silymarin 및 SPG 보충투여는 이들 혈청 염증성 사이토카인 농도를 모두 유의적으로 감소시켰다. Feng 등¹⁵⁾은 마우스 연구에서 12주간 고지방식이를 급여한 후 4주간 silymarin 30 mg/kg 투여하여, 혈장 TNF- α 및 IL-1 β 농도를 감소시켰고 인슐린저항성 등 대사성질환 제어에 효과적이라고 보고하였다. 또한 Guo 등¹⁶⁾은 마우스 연구에서 14주간 고지방식이 급여 후 3주간 silymarin 60 mg/kg 보충하였으며, 혈청 TC, TG 농도 및 ALT, AST 농도 감소와 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 농도 감소 효과를 보고하였다¹⁶⁾. Kim 등¹⁷⁾은 흰쥐에 LPS 쇼크를 주어 급성염증을 유발한 연구에서 작약감초탕 300 mg/kg 투여시 혈장 IL-6 및 IL-1 β 농도를 대조군에 비해 감소시켜 항염증 효과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 투여한 silymarin 및 SPG 역시 혈청 염증성 사이토카인 농도 감소와 혈청지질 농도 개선과 항염증 효능을 증명하였으나, 병용투여의 시너지 효과는 크게 관찰 할 수 없었다.

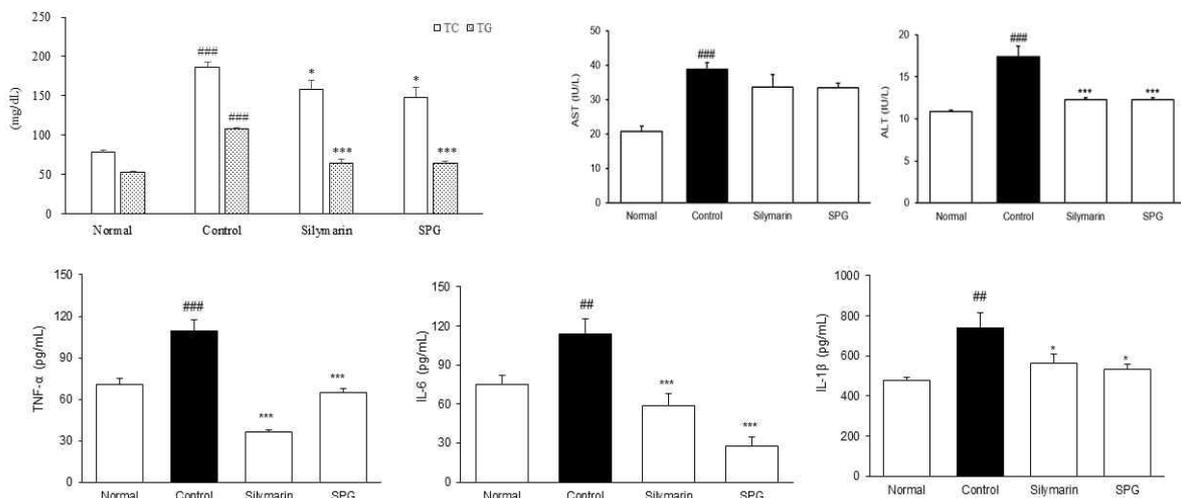


Fig. 1. Serum profiles. All values are mean±SE (n=9). ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$, compared with Normal group. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, compared with Control group. Control, 60% high-fat diet group; Silymarin, Control with silymarin 50 mg/kg/day group; SPG, Silymarin with Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day group. TC, total cholesterol. TG, triglyceride.

4. 간조직 지질 농도

사육기간 종료 후 간조직 지질 농도 측정 결과, Control군에서 Normal군에 비해 간조직 TG 및 TC 농도가 유의적으로 증가되었다 (Fig. 2). Control군에서 증가된 간조직 TG 농도는 Silymarin군 및 SPG군에서 유의적으로 감소되는 효과를 보였으며 TC 농도는 유의적 차이를 보이지 않았다. Silymarin과

강황 병용투여 연구에서는 병용투여가 간조직 TG 농도를 감소시켰으며 TC 농도에는 차이가 나타나지 않아 본 연구와 유사한 결과를 보였으며²¹⁾, 감초의 마우스 간보호 효능을 연구한 보고에서는 감초투여군에서 간조직 TG 및 TC 감소 효과를 보고한바 있다²⁵⁾.

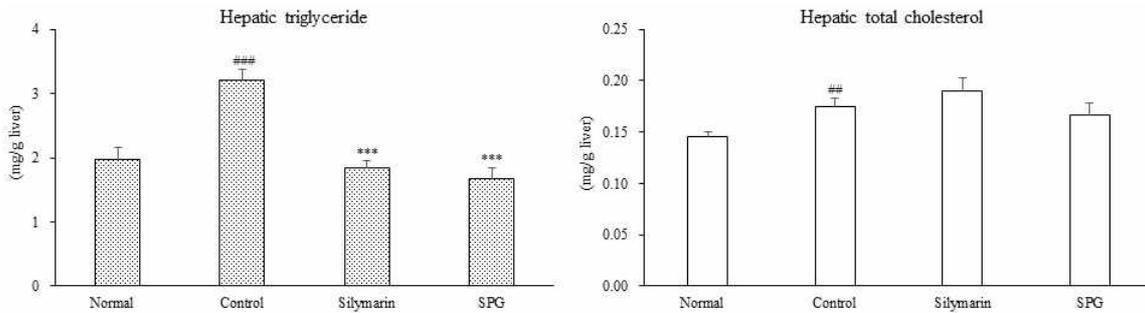


Fig. 2. Hepatic lipids. All values are mean±SE (n=9). ^{##}*p*<0.01 and ^{###}*p*<0.001, compared with Normal group. ^{***}*p*<0.001, compared with Control group. Control, 60% high-fat diet group; Silymarin, Control with silymarin 50 mg/kg/day group; SPG, Silymarin with Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day group.

5. 간 및 지방 조직의 형태학적 관찰

간조직 H&E 및 ORO 염색과 지방조직 H&E 염색으로 관찰한 형태학적 결과는 Fig. 3과 같다. 간조직 H&E 염색 결과 Control군에서 Normal군에 비해 많은 지방구들을 확인할 수 있었으며, ORO 염색 역시 Control군에서 Normal군에 비해 붉게 염색된 지방구들이 많은 것으로 나타났다. 반면, Silymarin군 및 SPG군에서는 Control군에 비해 간조직 H&E 결과에서 지방구들이 감소하였으며 ORO 염색 결과 역시 붉게 염색된 지방구들이 감소한 것으로 관찰되었다. 부고환 백색지방 조직의 H&E 염색 결과, Normal군에 비해 Control군에서 지방세

포의 크기가 크게 관찰되었으며 Silymarin군 및 SPG 투여군에서는 Control군에 비해 지방세포의 크기가 감소되는 것으로 관찰되었다. 고지방식이 유도 비만 마우스에서 silymarin 보충투여의 간보호 효능 연구에서 역시 silymarin의 간조직 지방구 감소와 지방간 억제 효과를 보고한바 있다¹⁶⁾.

간 섬유화를 확인할 수 있는 Masson's trichrome 염색 결과는 Fig. 4에 제시하였다. Masson's trichrome 염색 결과, Control군에서 Normal군에 비해 청색으로 염색된 섬유화된 부분을 확인할 수 있었다. 반면, Control군에서 청색으로 보인

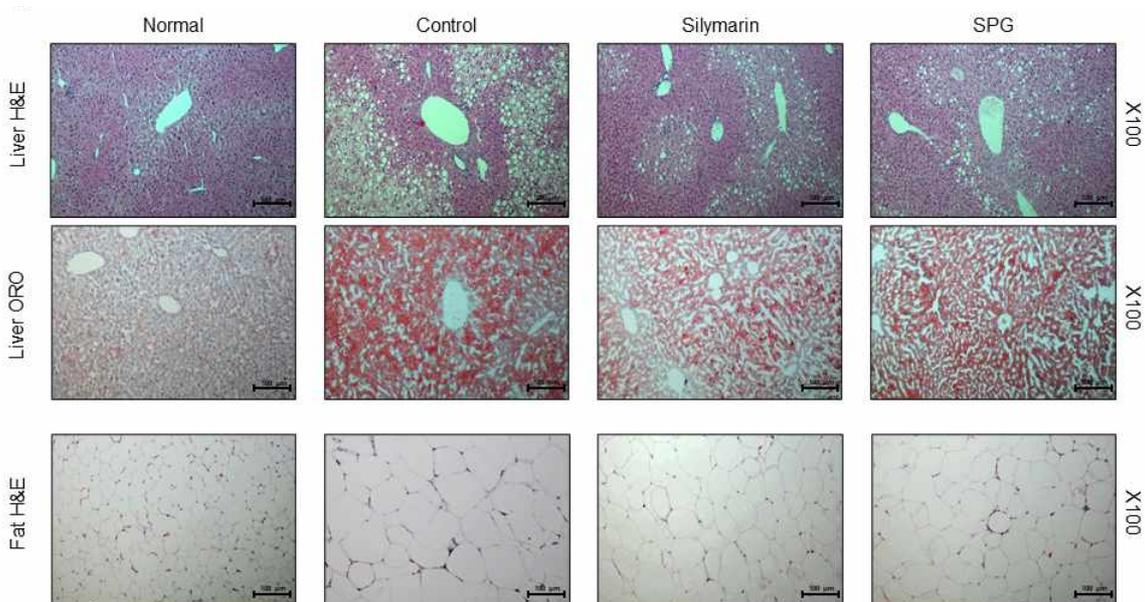


Fig. 3. Hepatic and white adipose tissue morphology. Control, 60% high-fat diet group; Silymarin, Control with silymarin 50 mg/kg/day group; SPG, Silymarin with Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day group. H&E, Hematoxylin and eosin stain. ORO, oil red O stain.

섬유화된 간조직은 Silymarin군 및 SPG군에서 감소된 것으로 나타나 고지방식이에 Silymarin 및 SPG 투여는 간에서 결합 조직의 증가로 섬유화가 진행되는 간손상을 예방할 수 있을 것으로 판단된다. Silymarin의 간조직 항섬유화에 대한 연구에서 Colica 등²⁶⁾은 silymarin의 항산화, 항염증, 항섬유화

작용과 함께 과체중인들의 특성 중 지질 대사 이상 및 간조직 지질축적 개선 효능을 보고하였고, Fehér 등²⁷⁾은 silymarin의 간조직 섬유화 예방효과와 중앙세포증식 및 혈관신생 억제 작용과 membrane 안정화 효과를 설명하여, silymarin 및 SPG 투여로 나타난 본 연구결과와 유사하였다.

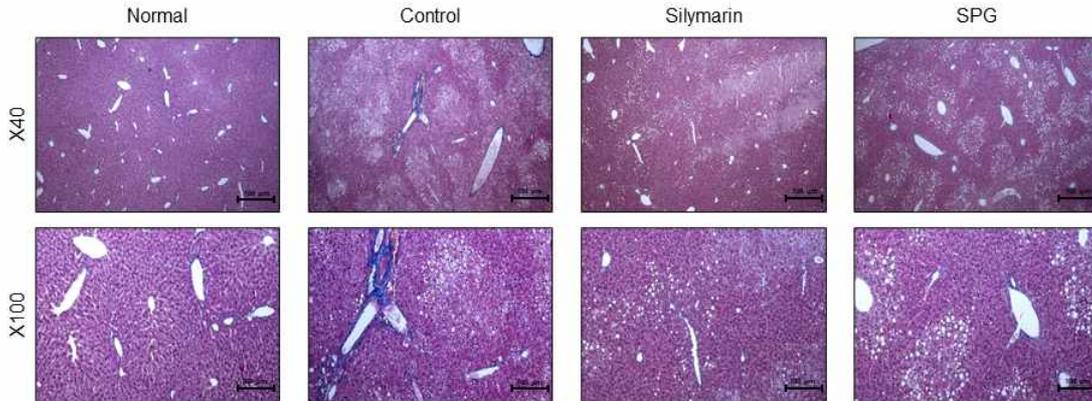


Fig. 4. Masson's Trichrome-stained liver sections. Control, 60% high-fat diet group; Silymarin, Control with silymarin 50 mg/kg/day group; SPG, Silymarin with Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day group.

6. 간조직 단백질 발현

간조직에서 측정된 단백질 발현 결과는 Fig. 5와 같다. Control군에서 Normal군에 비해 지질 및 스테롤 합성을 저해하는 효소인 AMPK 발현과 AMPK 발현의 상위 인산화 효소인 LKB1의 발현은 유의적으로 감소되었으며, 간에서 지질 합성에 관여하는 효소인 ACC, FAS 및 SCD-1의 단백질 발현의 경우 Control군이 Normal군에 비해 유의적으로 증가되었다. 반면, Silymarin 및 SPG 급여로 고지방식에서 감소된 AMPK 및 LKB1 단백질 발현은 유의적으로 증가하였고, 고지방식으로 증가된 ACC, FAS 및 SCD-1 단백질 발현은 Silymarin 및 SPG 투여로 모두 유의적으로 감소되었으며 특히 SPG 투여군에서는 ACC 및 FAS 발현 감소효과가 Silymarin 투여군 보다 크게 나타났다.

주로 간에서 지방산 산화와 관련된 대사를 조절하는 PPAR α 와 미토콘드리아 내막에서 지방산 산화작용에 관여하는 단백질인 UCP-2 및 지방산 산화 관련 조절효소인 CPT1A의 단백질 발현은 고지방식이 Control군에서 Normal군에 비해 유의적으로 감소되었으나, SPG 투여로 인해 PPAR α 및 UCP-2의 발현이 Control군에 비해 유의적으로 증가되었다. Silymarin 단독투여는 이들 단백질 발현이 Control군에 비해 증가되는 수치는 나타냈으나 유의성은 없었고, CPT1A 단백질만이 Control군에 비해 발현도가 유의적으로 증가되었다.

비알콜성지방간 마우스에서 silymarin과 강황 병용투여의 효과를 연구한 보고에서 silymarin 100 mg/kg군과 silymarin 50 mg/kg+강황 50 mg/kg 모두 대조군에 비해 간조직 AMPK 단백질 발현이 증가하였고, silymarin 단독 및 강황 병용투여에서 간조직 PPAR α 단백질 발현이 증가된 반면 FAS, SREBP-1 등 지질합성 단백질 발현 감소작용은 강황 병용투

여군에서 크게 나타나¹⁴⁾ 본 연구의 SPG 병용투여의 시너지효과 결과와 유사하게 나타났다. 또한 Feng 등¹⁹⁾의 연구에 따르면 밀크씨슬과 같은 추출물 단독 또는 병용투여가 간보호 효능을 나타냈으며, 특히 병용투여군의 경우 LKB1/AMPK signaling을 증가시켜 알콜성지방간을 감소시키는 효과가 단독군에서 보다 더 우수하였다.

AMPK는 대사 조절자로서 간조직 유전자, 효소 등 조절을 통한 지질대사 항상성에서 주요한 역할을 하며¹⁴⁾, LKB1은 AMPK의 upstream으로 LKB1의 인산화에 의해 AMPK가 활성화된다고 알려져있다²²⁾. 본 연구에서 silymarin 단독 및 작약감초 병용투여는 LKB1 및 AMPK 단백질 발현을 모두 증가시키면서, ACC, FAS 및 SCD-1 단백질 발현은 감소시켜, Li 등²⁹⁾의 연구에서 작약투여가 LKB1 및 AMPK 발현을 증가시키고 ACC, FAS 및 SCD-1 발현 감소 및 CPT1 발현을 증가시킴으로써 비알콜성지방간 병증을 완화시킨다고 보고한 연구결과와 매우 유사한 경향을 나타냈다.

결론적으로 본 연구에서 silymarin과 작약감초탕 병용투여군의 증가된 AMPK 발현은 PPAR α 및 UCP-1의 발현을 증가시켜 이화작용을 촉진시켰으며, 간에서 지질합성의 주요한 효소인 FAS, ACC 및 SCD-1 발현을 감소시켜 동화작용을 억제시켰다 볼 수 있다. 따라서 silymarin과 작약감초탕 병용투여는 간조직 지질축적을 억제시켰으며 비알콜성 지방간 억제에 효과적이라 판단된다. 본 연구의 이러한 효능은 silymarin 단독 및 작약감초탕 병용투여군에서 유사한 경향을 나타냈으며 병용투여군에서 간조직 지질 합성 및 산화 관련 단백질 발현 조절 효능이 단독투여군에서보다 다소 뛰어난 것으로 보여진다.

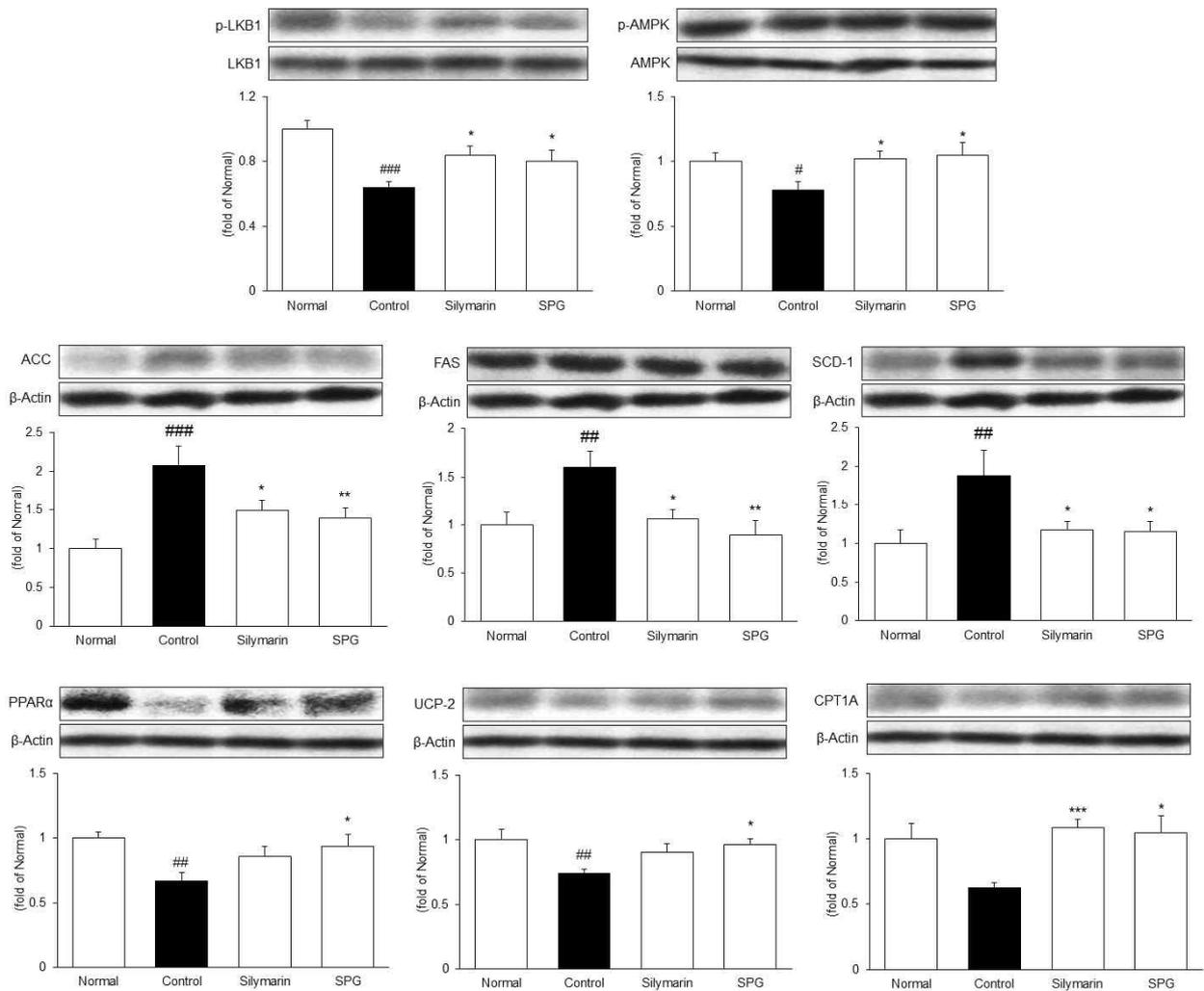


Fig. 5. Hepatic protein expression. All values are mean \pm SE (n=9). # p < 0.05, ## p < 0.01 and ### p < 0.001, compared with Normal group. * p < 0.05 and ** p < 0.01, compared with Control group. Control, 60% high-fat diet group; Silymarin, Control with silymarin 50 mg/kg/day group; SPG, Silymarin with Jakyakgamcho-tang 100 mg/kg/day group.

IV. 결 론

본 연구는 silymarin 단독 및 작약감초탕 병용투여를 고지방식이유도 비만마우스에 12주간 투여 하였으며 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. Silymarin 단독 및 작약감초탕 병용 투여는 체중 및 간 무게를 유의적으로 감소시켰다.
2. Silymarin 단독 및 작약감초탕 병용 투여는 마우스 혈청 TG, TC와 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 농도를 유의적으로 감소시키는 효능을 보였다.
3. Silymarin 단독 및 작약감초탕 병용 투여는 간조직 TG 농도를 감소시켰으며 형태학적 관찰에서 간조직 지방구들을 감소시킨 것으로 나타났다.

4. 간조직 단백질 발현에서 silymarin 단독 및 작약감초탕 병용투여는 LKB1 및 AMPK 발현을 증가시켜 지질합성에 관여하는 효소인 ACC, FAS 및 SCD-1 발현을 감소시켰으며, 지방산 산화 관련 인자인 PPAR α 및 UCP-2 단백질 발현도는 작약감초탕 병용투여군에서만 유의적으로 증가하였다.

결론적으로 silymarin 단독 및 작약감초탕 병용투여는 간조직 단백질 발현을 조절해 간조직 지질 축적을 억제시켰으며 혈액 지질 농도 및 염증성 사이토카인 농도를 감소시켰다. 한편, 작약감초탕 병용투여는 silymarin 단독투여군 비해 일부 간조직 지질합성 및 산화 관련 단백질 발현조절에서 우수한 것으로 나타났으나, 병용투여의 시너지효과가 두드러지게 관찰되지는 않았다. 따라서 향후 배합비 및 투여용량 조절을 통한 효능을 평가하여 최적의 처방을 결정하여, 병용투여가 어떠한 상호작용과 작용기전을 통하여 항염 및 간조직지질 축적이 억제되는지에 대한 추가 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 (세부과제 번호: PJ015272012022)과 한국연구재단 (No. 2018R1A5A 2025272)의 지원을 받아 수행된 것입니다.

References

- Kim CM. The Korean Association for the study of the Liver (KSAL). KASL clinical practice guidelines: Management of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2013; 19(4):325–348.
- Park SH, Plank LD, Suk KT, Park YE, Lee J, Choi JH, Heo NY, Park J, Kim TO, Moon YS, Kim HK, Jang HJ, Park HY, Kim DJ. Trends in the prevalence of chronic liver disease in the Korean adult population, 1998–2017. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(2):209–215.
- Xiao J, So KF, Liong EC, Tipoe GL. Recent advances in the herbal treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Tradit Complement Med*. 2013;3(2):88–94.
- Ni X, Wang H. Silymarin attenuated hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism and oxidative stress in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Am J Transl Res*. 2016;8(2):1073–1081.
- Sung WY, Yoon GR, Jang SM. 2000. Comparison of effective constituents of Korean paeony roots (*Paeoniae radix*) cultivated in different regions. *Kor Soc Postharvest Sci & Technol* 7: 297–301.
- Ro HS, Ko WK, Yang HO, Park KK, Cho YH, Lee YE, Park HS. 1999. Isolation of antihyperlipidemic substances from methanol extract of *Paeoniae radix*. *J Kor Pharm Sci* 29:55–60
- Lee SH, Jung JY, Park SM, Jegal KH, Byun SH, Cho IJ, Kim SC, Kim KJ, Kim YW. Hepatoprotective effect of *Paeoniae radix* via Nrf2 activation. *Kor J Herbol*. 2016;31(1):33–40.
- Shin SW, Yoon EK, Jo SH, Hawang JH. A Study on the 'Harmonizing All Medicinals' Property of Gancao. *J Korean Med Classics* 2020;33(1):179–196
- Lee EH, Baek SY, Kim KY, Lee SG, Kim SC, Lee HS, Kim YW. Effect of *Rheum undulatum* Linne extract and *Glycyrriza uralensis* Fischer extract against arachidonic acid and iron-induced oxidative stress in HepG2 cell and CCl4-induced liver injury in mice. *Herbal Formula Science*. 2016;24(3):163–174.
- Sung YY, Yuk HJ, Kim DS. Comparison of ingredient quantities and anti-fatigue effects of Jakyakgamcho-Tang according to extraction solvent. *Kor J Herbol*. 2020;35(2):31–38.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199–1200.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9–10):1231–1237.
- Folch J, Mee L, Stanley GSH. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem*. 1975;226(1):497–509.
- Kim YS, Yuk HJ, Kim DS. Comparison of efficacies of different Jakyakgamcho-tang extracts on H₂O₂-induced C2C12 cell viability. *Preprints*. 2020; 080130.
- Feng B, Meng R, Huang B, Shen S, Bi Y, Zhu D. Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice. *Free Radical Research*. 2016; 50(3): 314–327.
- Guo Y, Wang S, Wang Y, Zhu T. Silymarin improved diet-induced liver damage and insulin resistance by decreasing inflammation in mice. *Pharmaceutical Biology*. 2016;54(12):2995–3000.
- Kim BW. Anti-inflammatory effect of Jakyakgamcho-tang. *Korean J Orient Int Med*. 2010;31(2):365–371.
- Gu M, Zhao P, Huang J, Zhao Y, Wang Y, Li Y, Li Y, Fan S, Ma YM, Tong Q, Yang L, Ji G, Huang C. Silymarin ameliorates metabolic dysfunction associated with diet-induced obesity via activation of Farnesyl X Receptor. *Front Pharmacol*. 2016;7: 345.
- Yoon HJ, Park YS. Effects of *Scutellaria baicalensis* Water Extract on Lipid Metabolism and Antioxidant Defense System in Rats Fed High Fat Diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2010;39(2):219–226
- Dimiter A, Valentin AP, Kevin JT, Leonid P. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal Model Exp Med*. 2019;2:252–258
- Kim SB, Kang OH, Lee YS, Han SH, Ahn YS, Cha SW, Seo YS, Kong R, Kwon DY. Hepatoprotective effect and synergism of bisdemethoycurcumin against MCD diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *PLoS One*. 2016;24(1):142–142.
- Jeong CS, Jung KW, Jeong JS. Hepatoprotective Effect of Subfractions of *Carthamus tinctorius* L.

- Semen on the Reversal of Biotransformation Enzyme Activities in CCl₄-induced Hepatotoxic Rats. *J. Food Hyg. Safety*, 1999;14(2):172-178.
23. Plaa GL, Charbonneau M. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and Methods of Toxicity*, 4th ed. Philadelphia : Taylor and Francis, 2001:1145-98
 24. Skottova N, Krecman V. Silymarin as a potential hypocholesterolamic drug. *Physiol. Res*, 1998;47:1-7.
 25. Gou S, He M, Li B, Zhu N, Ni J. Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch in liver injury mice. *Natural product research*, 2021;35(24):6083-6087.
 26. Colica C, Boccuto L, Abenavoli L. Silymarin: An option to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 2017;23(47):8437-8438.
 27. Fehér J, Lengyel G. Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2012; 13(1):210-217.
 28. Feng R, Chen JH, Liu CH, Xia FB, Xiao Z, Zhang X, Wan JB. A combination of *Pueraria lobata* and *Silybum marianum* protects against alcoholic liver disease in mice. *Phytomedicine*, 2019;58:152824.
 29. Li YC, Qiao JY, Wang BY, Bai M, Shen JD, Cheng YX. Paeoniflorin ameliorates fructose-induced insulin resistance and hepatic steatosis by activating LKB1/AMPK and AKT pathways. *Nutrients*, 2018; 10(8):1024.