

NASH 동물모델에서 인진청간탕과 인진사령산의 효과규명

윤경수, 우홍정, 이장훈, 김영철
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

Effect of *Injinchunggan-tang* & *Injinsaryung-san* on NASH induced by MCD-diet in A/J mice

Kyoung-su Yun, Hong-jung Woo, Jang-hoon Lee, Young-chul Kim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-hee University

ABSTRACT

Objective : The aim of this study is to investigate the preventive effect of *Injinchunggan-tang* (YJCGT) & *Injinsaryung-san* (YJSRS) on MCD-diet-induced NASH in A/J mice.

Methods : A/J mice were divided into 4 groups: Normal group (normal diet without any treatment), Control group (MCD diet only), YJCGT group (MCD diet with YJCGT), and YJSRS group (MCD diet with YJSRS). After 5 weeks, body weight, liver weight, biochemical parameters for liver function test, histological changes, and real-time PCR were assessed.

Results : Mice lost body weight with the MCD diet and the YJCGT and YJSRS groups lost less than the control group, though showed no statistical significance. Liver weights were decreased by the MCD diet, but not significantly. In the liver function test, all the values were increased with the MCD diet, though some did not show significance. Alp and ALT levels were significantly less increased by YJCGT compared to the normal ($p<0.05$). All values were decreased or increased compared to the control by treatment though showed no significance possibly due to insufficient sample numbers. In histological findings of the livers, MCD-diet induced severe fatty change and collagen accumulation in the livers, but this fatty change was reduced in the YJCGT and YJSRS groups and fibrogenesis was inhibited significantly with $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively. In real-time PCR analysis, YJCGT and YJSRS showed inhibitory effect on liver fibrogenesis by reducing associated gene expressions caused by MCD diet.

Conclusion : YJCGT and YJSRS are considered to be possible candidates for the treatment of patients with NASH and/or liver fibrosis.

Key words : *Injinchunggan-tang*(YJCGT), *Injinsaryung-san*(YJSRS), MCD-diet, NASH, A/J mice

1. 서론

비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)은 과도한 음주력이 없으면서도 알코올성

간염과 동일한 병리학적 변화인 지방변성, 염증세포 침윤, 간세포파괴, Mallory 소체 및 섬유화 등이 발생하는 질환을 말한다¹. NASH는 식생활이 풍요해지고 고지방 식이를 섭취할 기회가 많아지면서 빈도가 증가하고 있다². NASH는 비만, 당뇨, 고지혈증 등의 대사질환의 일부분으로 발현되기도 하며, 일부는 만성 간질환으로 진행하게 된다³.

근래에 NASH의 병리기전과 치료 약물에 대한

· 교신저자: 김영철 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120
E-mail: yckim@khu.ac.kr

연구가 활발히 이루어지고 있으나 아직까지 정확한 기전이 규명되지 않았고, 표준 치료법도 제시되지 못하고 있어 앞으로 해결해야 할 과제가 많은 실정이다.

NASH의 동물모델에는 고지방식이, MCD-diet 등이 있는데, MCD-diet 모델은 설치류 동물에서 간섬유화, 간경변증을 동반하는 지방간염을 유발하고⁴ 이는 인체의 지방간염의 병태모델과 유사하다고 인정되고 있다.⁵

간장 질환에 대표적인 처방인 인진청간탕은 淸熱利濕시키는 인진사령산에 수종의 한약재를 가미한 처방으로 임상에서는 간질환의 기본처방으로 사용되고 있다.⁶ 실험적으로는 간섬유화 억제, apoptosis 억제, 간세포보호, TNF- α 신호전달 억제작용 등이 보고되고 있다.⁷⁻⁸

인진사령산은 만성간질환의 치료에 淸熱利濕을 목표로 널리 사용되고 있다. 실험적으로 간세포 활성을 높이고, apoptosis 억제, 세포손상 억제 등이 보고되고 있다.⁹⁻¹⁰

본 연구에서는 급만성간질환에 효과적인 것으로 보고되고 있는 인진청간탕과 인진사령산이 지방대사의 장애로 인한 지방간염에도 쓰일 수 있을 것이라 판단되어 MCD-diet로 유발시킨 NASH 병태모델에 인진청간탕과 인진사령산이 미치는 영향을 살펴보았다. 체중측정, 간중량측정, 간기능검사를 하고, 병리조직학적 변화를 관찰하고, Real-Time PCR로 간섬유화 관련 유전자의 발현정도를 관찰하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료 및 동물

1) 재료

본 실험에 사용한 약재는 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서¹¹에 근거하여 경희대 부속 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며 1첨당 내용 및 용량은 Table 1, Table 2와 같다.

Table 1. Prescription of *Injinchunggan-tang*

Herb	Scientific name	Dose(g)
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	50
地榆	<i>Sanguisorbae Radix</i>	15
覆盆子	<i>Rubi Fructus</i>	12
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	12
豬苓	<i>Polyporus</i>	12
白茯苓	<i>Hoelen</i>	12
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	8
蘿藦子	<i>Raphani Semen</i>	8
青皮	<i>Aurantii Immatri Percarpium</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma ROSCOE</i>	12
Total		153

Table 2. Prescription of *Injinsaryung-san*

Herb	Scientific name	dose(g)
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	50
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	24
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	12
白茯苓	<i>Hoelen</i>	12
豬苓	<i>Polyporus</i>	12
Total		110

2) 동물

혈청검사에서부터 각종 감염이 인정되지 않고, 일반증상과 체중감소가 없는 20g 내외의 A/J Slc mouse 암컷(중앙동물실험)을 실험에 사용하였다. 실험동물은 멸균한 polycarbonate cage에 방사선 멸균한 시판 고형사료(대한실험동물센터)와 MCD-diet (Methionine Choline Deficient diet) 및 정제한 물을 자유 공급하였으며 1주 동안 normal diet를 섭취하면서 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험을 시작하였다. 실험기간동안 명암주기 12시간 간격, 온도 25±2°C, 습도 55%로 실험실 환경을 유지하였다. MCD-diet의 조성은 다음과 같다.

Table 3. Constituents of MCD-diet

Ingredient	gm/Kg
Cornstarch	100
Dextrin	100
Sucrose	408.58
Cellulose(401855)	50
Corn Oil	50
Salt Mix #200000	3.5
Sodium Bicarbonate	4.3
Vitamin Mix #300050	10
Primex	100
Ferric Citrate, U.S.P.	0.12
total	1000.00

2. 방법

1) 검액의 조제

(1) 약제의 추출

인진청간탕 153g 및 인진사령산 110g을 환류추출기(Duksan, Korea)에 넣고, 냉각기를 부착한 상태에서 증류수를 1000ml를 가하여 2시간씩 2회 가열 추출하였다. 추출액을 filter paper로 여과 후, Rotary evaporator(Buchi社RE121, SWISS)로 감압 농축하여 농축액을 얻었다.

(2) 동결건조

이 농축액을 동결건조기(EYELA, Japan)로 건조하여 인진청간탕 20g, 인진사령산 18g을 얻었다.

(3) 얻어진 동결건조 엑기스를 100mg/ml의 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 실험설계

(1) 지방간염 유발 및 검액투여

실험동물들을 정상군(Normal diet without any treatment), 대조군(MCD-diet only), 인진청간탕군(MCD-diet+인진청간탕 1g/kg), 인진사령산군(MCD-diet+인진사령산 1g/kg)의 4군으로 나누고 군 당 10마리씩 배치하였다. 검액은 매일 오전 10시경 1회 주 6회씩 5주간 경구 투여하였다. 또한 정상군 및 대조군에는 생리식염수를 동량으로 5주간 경구투여 하였다.

3) 체중의 측정

5주의 실험기간동안 실험동물의 체중을 주 1회씩 측정하였다.

4) 간중량 측정

5주간 MCD-diet 및 약제투여 후 mouse를 에테르 마취하에 채혈 및 방혈치사시킨 다음 간장을 적출하여 간의 중량을 측정하였다.

5) 간기능검사

5주간의 약제투여 후 2일 후 동물을 희생하고 혈액을 채취하여 생화학검사(Beckman Coulter, LX-20)를 시행하였다. 검사항목으로는 AST, ALT, Total Bilirubin, Alkaline Phosphatase를 측정하였다.

6) 병리조직학적 검사

5주간 MCD-diet 및 약제투여 후 mouse를 에테르 마취하에 채혈 및 방혈치사시킨 다음 간장을 적출하여 10% 중성포르말린 용액에 고정된 후 파라핀포매 후 로타리 마이크로톰으로 4 μ m 두께로 조직절편을 제작한 다음 H-E 염색 및 Masson-Trichrome 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였고, I-Solution(iMTechnology, Vancouver, Canada) program을 이용하여 지방축적으로 인한 간조직의 공포의 면적비율 및 Collagen 축적 영역의 면적비율을 측정하였다.

7) 역전사(RT) 및 실시간 정량적 중합효소연쇄반응(Real-Time PCR)

(1) RNA 추출

RNeasy Mini Kit(Qiagen, TX, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였다.

즉, 동물을 희생한 후 간조직을 적당량 취하여 RNAlater solution(Qiagen, TX, USA)에 넣었다가 24시간 이상 지난 다음에 간조직을 70-80mg 내외로 채취하여 50ml tube에 넣고 BME-RLT buffer(Qiagen, TX, USA) 1ml을 가한 후 Tissue Miser (Fisher Scientific, CA, USA)를 이용하여 homogenize 한 후 얼음 위에서 10분간 방치하여 상층액을 얻고 이것을 Qiagen Shredder column(Qiagen, TX, USA)에

통과시켜 잡질을 제거하였다. 그런 다음 Qiagen RNeasy Mini Kit를 이용하여 제작사의 protocol에 따라 RNA를 분리하였다.

(2) cDNA 합성

Reverse Transcription System(Promega, WI, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

즉, MgCl₂(25mM) 4 μ l, 10X RT buffer 2 μ l, dNTP(10mM) 2 μ l, Random primer 1 μ l (0.5 μ g), Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ l, AMV RT 0.6 μ l (15u), target RNA 1 μ g을 넣고 나

머지는 DEPC water를 첨가하여 총 용량이 20.1 μ l 가 되게 하여 25 $^{\circ}$ C 10분, 42 $^{\circ}$ C 1 시간, 95 $^{\circ}$ C 5분 동안 처리하여 cDNA를 제작하고 5 $^{\circ}$ C에서 차게 해서 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였으며 필요할 때마다 사용하였다.

(3) Primer 제작

House keeping gene으로는 GAPDH를 사용하고, target gene으로는 Procollagen Type Ia1, ASMA, TGF β 1, MMP 2, TIMP1, TIMP2, PDGFR β 의 gene을 사용하였으며 각 primer의 sequence는 다음과 같다.

Table 4. Oligonucleotide Primers Used for Quantitative RT-PCR Analysis(All sequences are listed 5' to 3')

Gene	Sequences	product size(bp)
GAPDH-F	5'- CAA CGA CCC CTT CAT TGA CC -3'	146
GAPDH-R	5'- GGT CTC GCT CCT GGA AGA TG -3'	
Procoll1a1-F	5'- ATC CCT GAA GTC AGC TGC ATA -3'	145
Procoll1a1-R	5'- TGG GAC AGT CCA GTT CTT CAT -3'	
ASMA-F	5'- TCC TCC CTG GAG AAG AGC TAC -3'	140
ASMA-R	5'- TAT AGG TGG TTT CGT GGA TGC CC -3'	
TGF β 1-F	5'- TGC GCT TGC AGA GAT TAA AA -3'	154
TGF β 1-R	5'- CTG CCG TAC AAC TCC AGT GA -3'	
MMP 2-F	5'- ACC CAG ATG TGG CCA ACT AC -3'	140
MMP 2-R	5'- TAC TTT TAA GGC CCG AGC AA -3'	
TIMP2-F	5'- GCC AAA GCA GTG AGC GAG AAG -3'	155
TIMP2-R	5'- CAC ACT GCT GAA GAG GGG GC -3'	
TIMP1-F	5'- ACG AGA CCA CCT TAT ACC AGC G -3'	149
TIMP1-R	5'- GCG GTT CTG GGA CTT GTG GGC -3'	
PDGFR β -F	5'- CTT TGT GCC AGA TCC CAC CA -3'	101
PDGFR β -R	5'- TCA CTC GGC ACG GAA TTG TC -3'	

(4) Real-Time PCR(실시간 정량적 역전사 증합효소연쇄반응)

1.5ml 시험관에 2.4 μ l의 25 mM MgCl₂, 2 μ l의 Lightcycler fast start enzyme이 포함된 DNA master SYBR green I, 10pmol의 sense와 antisense 시발체, 증류수를 포함하여 18 μ l로 최종용량을 조정하였다. 18 μ l의 혼합물에 2 μ l의 cDNA를 혼합하여 모세관(capillary tube)에 분주한 다음 뚜껑을 닫고 700g, 5초간 원침한 다음 Lightcycler 증폭기

(Applied Science, Mannheim, Germany)에 장착하였다. Annealing 온도는 55 $^{\circ}$ C로서 PCR 생성물의 크기에 따라서 25bp/sec로 하여 real-time PCR을 시행하였다. 그런 다음 각 유전자의 발현 정도를 GAPDH 와의 상대적인 수치로 계산하였다.

8) 통계 및 분석

통계처리는 SPSS 14.0.K를 사용하여 one-way ANOVA(일원배치분산분석)를 하였고, 사후검정으로는 Scheffe 검정을 사용하였으며, 유의수준 0.05

이하를 유효한 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. 체중의 변화

정상군에서는 체중변화가 없었고, 대조군, YJCGT 군 및 YJSRS군 모두에서 유의성 있게 체중이 감소하였다. YJCGT군과 YJSRS군에서는 대조군에 비하여 적게 감소되었지만 유의성은 인정되지 않았다(Table 5, Fig. 1).

Table 5. Body Weight Change of A/J Mice with MCD-diet and Treatments

	0week	1week	2weeks	3weeks	4weeks	5weeks
Normal	22.8±1.5	23.3±1.5	23.0±1.9	22.7±2.5	23.3±2.4	22.3±3.0
Control	21.1±1.5	17.0±1.3**	15.3±1.1**	13.5±1.0**	13.1±1.0**	13.1±1.0**
YJCGT	21.8±1.0	17.8±0.9**	16.4±0.8**	14.7±0.7**	14.1±0.8**	13.8±0.7**
YJSRS	22.2±1.4	17.8±1.5**	16.3±1.1**	14.6±0.8**	14.4±1.0**	13.9±1.1**

Values represent mean ± SD

* : p<0.05 compared with the normal

** : p<0.01 compared with the normal

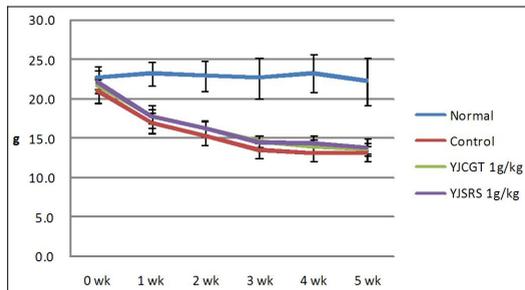


Fig. 1. Body weight change of MCD-diet induced mice with/without treatment.

Significant body weight changes were observed from the first week of the experiment in 3 experimental groups(p<0.01). Weight loss in the control group was less than the other two treatment groups, though showed no significance.

2. 간중량 변화

간장 중량이 control군과 YJCGT군에서는 유의성 있게 감소하였지만(p<0.05), 이것을 다시 각 동물 체중 평균으로 나누어서 비교해 보았을 때에는 간장의 중량이 체중 대비 각 실험군 모두에서 증가된 것으로 나타났다(Fig. 2). 대조군에 비해 YJCGT군과 YJSRS군에서는 유의성은 없었다.

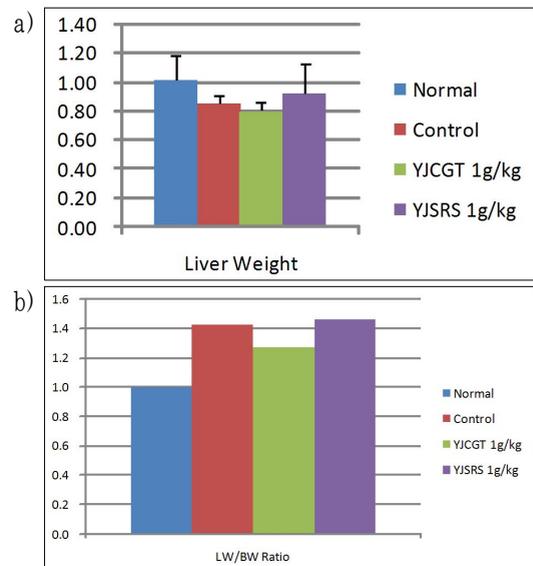


Fig. 2. Liver weight changes of each experimental groups.

a) Decreased liver weight in all three MCD-diet treated groups were observed. b) Liver weight/body weight(LW/BW) ratio of the MCD-diet induced experimental groups were higher than the normal group.

3. 간기능 검사

인진청간탕은 MCD-diet로 유발된 ALP, ALT의 상승을 대조군에 비하여 유의하게 억제하였으며,

인진사령산은 AST의 상승을 억제하였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 6, Fig. 3).

Table 6. Effects of YJCGT(*Injinchunggan-tang*) and YJSRS(*Injinsaryung-san*) on MCD-Diet Induced Liver Function in A/J Mice by Biochemistry

	T-bil(mg/dL)	ALP(IU/L)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)
Normal	0.03±0.01	218±75	113±37	35±8
Control	0.21±0.13	297±63*	158±29*	253±84**
YJCGT	0.24±0.10*	262±47	197±39**	140±55*+
YJSRS	0.18±0.11	320±63*	141±20	188±76*

Values represent mean ± SD

* : p<0.05 compared with the normal

** : p<0.01 compared with the normal

+ : p<0.05 compared with the control

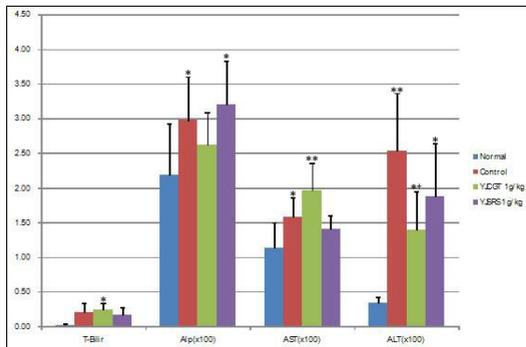


Fig. 3. Effects of YJCGT and YJSRS on several biochemical values in the serum of each groups.

All the values were increased with MCD-diet though some did not show statistical significance. ALT level was less increased by YJCGT significantly compared to the normal(p<0.05). All other values

were decreased or increased compared to the control by treatment though showed no significance possibly due to insufficient sample numbers.

4. 병리조직학적 검사

1) 지방 침착 관찰

정상군에서는 간소엽의 입체구조가 잘 유지되었고, 문맥 주위 및 중심정맥 주위의 섬유화 및 간세포 괴사나 염증반응은 관찰되지 않았으나, 대조군, YJCGT군과 YJSRS군에서는 간소엽의 입체구조가 소실되면서 많은 지방축적이 관찰되었다. YJCGT군과 YJSRS군에서는 지방축적이 대조군에 비하여 감소하였고, 지방입자가 작은 편이었으나 image 분석을 통한 면적 측정에서는 유의성이 없었다(H-E 염색)(Table 7, Fig. 4, Fig. 5).

Table 7. Percentage of Fatty Area in the Liver Tissue

	Normal	Control	YJCGT 1g/kg	YJSRS 1g/kg
% of Fatty Area	2.99±0.72	52.08±3.32***	41.93±5.26***	41.34±9.12***

Values represent mean±SD

*** : p<0.001 compared to the normal

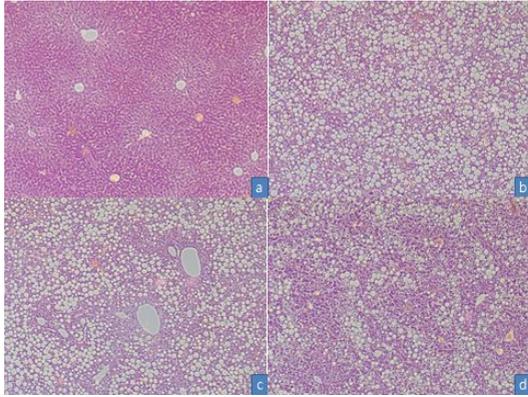


Fig. 4. Histological findings of MCD-diet induced liver damages in A/J mice.

Fatty areas were increased significantly(white holes in the upper panel, H-E stain, x100). a)Normal diet, b)MCD-diet only, c)MCD-diet + YJCGT 1g/kg, and d)MCD-diet + YJSRS 1g/kg.

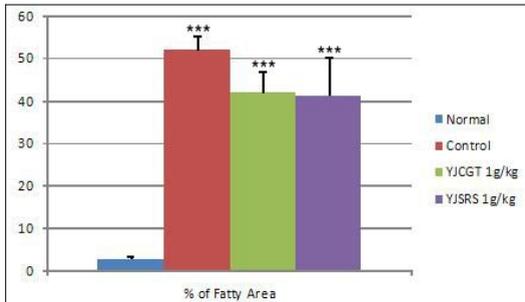


Fig. 5. Histological findings of MCD-diet induced liver damages in A/J mice.

Fatty areas were increased significantly by MCD-diet. YJCGT and YJSRS inhibited fat accumulation in the liver, though showed no statistical significance.

2) 콜라겐 침착 관찰

Collagen 침착은 정상군에서는 혈관구조물에 정상적으로 분포하는 것 외에는 관찰되지 않았으나 대조군에서는 많은 Collagen이 관찰되어 섬유화가 심하게 진행되었음을 알 수 있었고, YJCGT군과 YJSRS군에서는 대조군에 비하여 섬유화가 억제되었다(Masson-Trichrome 염색)(Fig. 6).

정상군에 비해 실험군들의 콜라겐 침착은 유의성 있게 증가하였고($p < 0.01$), 콜라겐의 침착은 YJCGT군과 YJSRS군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(YJCGT군은 $p < 0.05$, YJSRS군은 $p < 0.01$)(Table 8, Fig. 7).

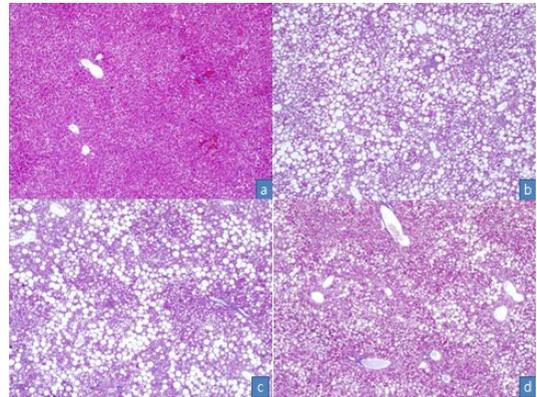


Fig. 6. Histological findings of MCD-diet induced liver damages in A/J mice.

Collagen accumulation was increased significantly (blue areas in the upper panel, Masson-trichrome stain, x100). a)Normal diet, b)MCD-diet only, c)MCD-diet + YJCGT 1g/kg, and d)MCD-diet + YJSRS 1g/kg.

Table 8. Percentage of Collagen in the Liver Tissue

	Normal	Control	YJCGT 1g/kg	YJSRS 1g/kg
% of Collagen	1.44±1.02	11.77±1.82**	7.61±2.93**+	5.74±1.50***

Values represent mean±SD

** : $p < 0.01$ compared to the normal

+: $p < 0.05$ compared to the control

***: $p < 0.01$ compared to the control

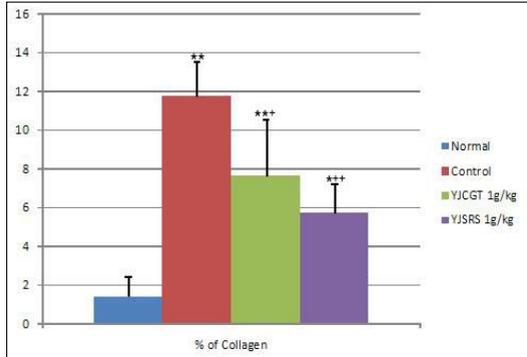


Fig. 7. Histological findings of MCD-diet induced liver damages in A/J mice.

Collagen accumulation was increased significantly by MCD-diet. YJCGT and YJSRS inhibited collagen accumulation in the liver significantly by $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

5. Real-Time PCR(실시간 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응)

MCD-diet는 Collagen type Ia1(COLL1), PDGFBR1, MMP2 유전자의 발현을 증가시켰고, ASMA, TGFb1, TIMP I, TIMP II 유전자의 발현을 감소시켰다. YJCGT군과 YJSRS군에서는 대조군에서 상승된 COLL1, PDGFBR1, MMP2 유전자의 발현이 억제되었고, 대조군에서 저하된 ASMA, TGFb1, TIMP I 유전자의 발현은 증가되었다. 다만 대조군에서 저하된 TIMP II 유전자의 발현은 YJCGT군과 YJSRS군에서 더욱 저하되었다(Table 9, Fig. 8).

Table 9. Effects of YJCGT and YJSRS on Gene Expressions in the MCD-Diet Induced Liver Damage

	GAPDH	COLL1	ASMA	PDGFBR1	TGFb1	MMP2	TIMP I	TIMP II
Normal	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Control	1.000	1.879	0.648	1.204	0.682	1.807	0.467	0.861
YJCGT 1g/kg	1.000	1.067	0.744	0.660	0.719	0.955	0.626	0.641
YJSRS 1g/kg	1.000	1.179	0.800	0.607	0.918	0.855	0.509	0.598

Values represent relative ratio of each genes normalized by GAPDH

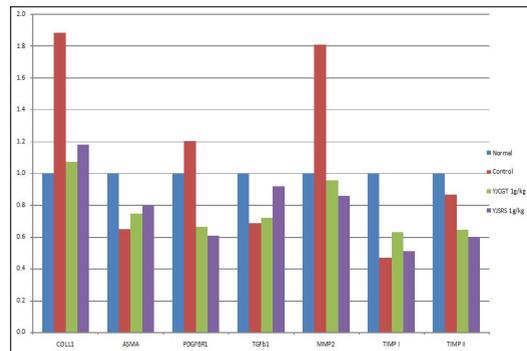


Fig. 8. Effects of YJCGT and YJSRS on the expressions of fibrosis markers in MCD-Diet induced mice liver.

Relative expression level of each genes normalized by GAPDH is set to 1.

IV. 고찰

NASH의 진단은 간조직 검사에서 지방간염이 있으며, 음주력이 없고(1주에 40g이하의 에탄올 섭취), 바이러스성 간염, 약물성 간염, 자가면역성 간염 등이 배제되어야 한다¹². NASH의 실제 발병률과 유병률은 최근까지 연구가 부족했던 게 사실이다¹³. NASH의 진단은 간생검을 통해 확진되며³, 일반 대증을 상대로 비침습적 검사로 찾아지는 경우들은 단순 지방증과 NASH가 구분되기 어렵다. 다만 NASH 환자에서 체질량지수가 높을수록, ALT 값이 높을수록 병리적으로 심한 NASH를 추정할 수 있다¹⁴.

NASH의 병리소견은 알코올성 지방간염과 유사

하며¹⁵, 특징적인 소견으로는 거대세포성 지방침윤 (macrovesicular steatosis), 간소엽의 염증세포 침윤(lobular inflammation), 간세포의 풍선양 변성 (ballooning degeneration), 정맥주위 및 동주위 섬유화(perivenular and perisinusoidal fibrosis) 등이다¹⁶.

알코올성 지방간과 NASH와의 검사상 차이점은 알코올성 지방간에서 MCV(mean corpuscular volume), γ -GT(gamma glutamyl transferase)가 유의하게 높았으며, NASH에서는 체지방률과 ESR이 알코올성 지방간 군에 비해 유의하게 높았음이 보고되었다¹⁷.

NASH의 병태 모델로는 high-fat diet와 MCD-diet 모델이 주로 쓰이는데, 두 모델의 차이는 항산화반응물에 대한 유전자의 증가가 MCD-diet 모델에만 있고, high-fat diet 모델에는 없다는 것이다¹⁸. MCD-diet 모델로 한 연구에는 MCD-diet가 lipid peroxidation, hepatic stellate cell(HSC) 활성도를 증가시키고, TNF- α , TGF- β 1, procollagen Ia1의 유전자 발현이 증가된 간염을 유발시키고, MMP2와 TIMP1, TIMP2의 유전자 발현이 증가되었다¹⁹. 충분한 식이를 한 쥐보다도 MCD-diet를 한 쥐의 혈청과 간세포에서 GSH 수치가 35% 감소하였다²⁰.

인진청간탕은 인진사령산에 地榆 覆盆子 蘿藦子 靑皮 砂仁을 加味한 方劑이며 현재 임상에서 清熱 利濕을 目標로 急慢性肝疾患에 頻繁히 投與되고 있는 處方이다⁶.

인진청간탕은 전격성 간염을 일으킨 마우스의 생존률을 높이는 효과²¹, MHV-2M 및 水浸스트레스로 유발한 간경변증에서 간기능 개선, 간 보호, 간손상 회복, 재생에 유의한 효과²², etoposide에 손상된 간세포를 보호하고 Cpp32 protease를 억제하였으며 Cpp32, Fas를 억제하고 Bcl-2와 Bcl-XL을 촉진시킨다고 보고²³되었다. 인진사령산은 HepG2 cell에서 간세포활성을 높이고 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포 손상을 억제한다^{7,9,10}고 하였다.

본 실험은 바이러스성 간염에서 사용되는 인진청간탕과 인진사령산이 NASH의 모델중 MCD-diet로 유발된 경우에서 간기능, 지방간정도, 간섬유화에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

MCD-diet로 유발되는 병태모델에서는 Fat로 유발시킨 병태모델과 다르게 체중감소가 나타는데, 정상군보다 실험군에서 유의성 있게 체중이 감소하였으나, 인진청간탕군과 인진사령산군은 대조군보다는 체중이 덜 감소하였으나 유의성은 없었다.

간장 중량에서는 대조군과 인진청간탕군에서는 유의성있게 감소하였지만($p < 0.05$), 이것을 다시 각 동물 체중 평균으로 나누어서 비교해 보았을 때에는 간장의 중량이 체중 대비 각 실험군 모두에서 증가된 것으로 나타났으며 대조군과 실험군간의 유의성은 인정되지 않았다.

간기능검사에서 MCD-diet를 섭취한 대조군에서는 ALP와 ALT가 유의성있게 상승하였고 total bilirubin, AST는 상승하였다. 인진청간탕을 사용한 경우 ALP와 ALT의 상승을 억제하였고 total bilirubin과 AST는 대조군보다 상승하였고, 인진사령산에서는 total bilirubin, AST, ALT의 상승을 억제하였고 ALP는 대조군보다 상승하였다. 인진청간탕과 인진사령산 모두 ALT 상승을 억제하여 간 보호 작용을 하는 것으로 나타났다. 다만 인진청간탕에서 담즙정체를 반영하는 ALP를 억제하였지만 total bilirubin은 도리어 증가하였고, 인진사령산은 total bilirubin은 억제하였지만 ALP는 도리어 상승하였다. 따라서 인진청간탕과 인진사령산은 빌리루빈 배출과정과 빌리루빈 생성과정에 미치는 영향을 다른 것으로 사려된다. 향후 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

간의 조직학적 검사에서 MCD-diet는 지방축적과 collagen 침착을 일으켰으며, 인진청간탕과 인진사령산은 모두 지방축적을 억제하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다. 반면에 collagen 침착에 대하여서는 인진청간탕과 인진사령산의 투여가 각각 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 의 유의수준으

로 유의한 억제효과가 있음이 관찰되었다.

간섬유화가 진행되는 과정에 따라 관여되는 유전자가 다르다. 간섬유화의 중요기전은 간성상세포의 활성화인데, 활성화된 간성상세포는 근섬유아세포와 유사한 형질을 띠고, 세포증식이 증가하며 다양한 세포외기질 물질을 합성하고 분비한다. 활성화된 간성상세포는 세포질내 지방적이 감소하고, alpha smooth muscle actin(ASMA)을 발현하며, 세포외기질 구성 단백을 합성하고 분비하는 특징을 보인다.²⁴⁻²⁶ TGFβ는 collagen 합성의 강력한 촉진인자이고²⁷, MMP와 TIMP와의 불균형으로 인한 세포외기질의 합성과 분해사이에 불균형으로 일어난다²⁸.

간섬유화와 연관된 유전자를 RT-PCR을 통하여 살펴보았는데, MCD-diet를 시행한 대조군에서는 콜라겐 합성이 증가될 때 발현이 증가되는 Collagen type Ia1, PDGFR1, MMP2 유전자가 증가하였고, MMP 합성을 억제하는 TIMP I, II 유전자의 발현은 억제하였다. 그러나 간성상세포가 활성화될 때 증가되는 ASMA의 발현은 감소하였고 fibrogenesis 때 증가되는 TGFβ1을 정상군보다 도리어 억제되었다. 이러한 점은 MCD-diet로 유발되는 간섬유화는 인간 성상세포 활성화에서 섬유화가 진행되는 양상과 정확하게 일치하지는 않다는 점을 시사한다. 다만 섬유화 진행에서 변화되는 Collagen type Ia1, MMP2, PDGFR1 증가와 TIMP I, II 감소는 동일한 양상으로 나타났다.

인진청간탕과 인진사령산을 투여한 결과 Collagen type Ia1, MMP2, PDGFR1 유전자의 발현은 대조군에 비하여 억제되었고, TIMP I 및 TIMP II 유전자의 발현은 상승시키는 것으로 나타났다.

이상에서 인진청간탕과 인진사령산은 MCD-diet로 유발시킨 NASH 병태모델에서 간세포 보호작용과 지방축적억제, 간섬유화 억제작용을 하였으며, 간섬유화 억제작용은 간섬유화시 증가되는 Collagen type Ia1, MMP2, PDGFR1 유전자의

발현을 억제하고, TIMP I 및 TIMP II 유전자의 발현을 증가시키면서 이루어지는 것으로 판단되었다.

MCD-diet를 이용한 NASH 병태모델은 영양불균형에 의한 지방간염 유발 병태모델로서 인체에서 보이는 영양과잉에 따른 지방축적 및 염증발생의 소견과는 차이가 있으므로 인체에서의 병태와 보다 유사한 모델의 개발이 필요한 실정이다. 하지만 현재까지 NASH 병태모델로서 MCD-diet 유발 동물모델이 학계에서 인정되고 있으며 관련된 논문들이 발표되고 있는 것은 병태가 완전히 일치하는 것은 아니지만 연구목적으로 인정받고 있음을 의미하는 것이라 할 수 있다. 이에 본 연구의 결과를 바탕으로 고려할 때, 인진청간탕이나 인진사령산의 투여는 염증으로부터 간세포를 보호할 뿐 아니라 NASH에서 지방축적을 감소시키고 섬유화 진행을 억제하는 효과를 발휘할 수 있을 것으로 생각되었다. 부족하나마 이번 연구의 결과는 NASH 병태 모델을 이용한 한약처방의 치료효과를 검증하는 초기의 시도라 할 수 있으며, 보다 효과적이고 임상에 적용하기 용이한 처방을 구성하기 위하여서는 다양한 약제의 검증 및 처방 구성을 위한 노력이 지속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

인진청간탕과 인진사령산이 A/J mice에 MCD-diet로 유발시킨 NASH 병태모델에 미치는 효능을 관찰하기 위하여, 체중변화, 간중량변화, 간기능 검사, 병리조직학적 검사(Hematoxylin & Eosin 염색, Masson-Trichrome 염색) 및 간섬유화와 연관된 유전자 검사를 Real-Time PCR를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MCD-diet는 mouse의 체중을 유의성 있게 감소시켰으며, 인진청간탕이나 인진사령산에서는 대조군에 비해 체중감소가 심하지 않았으나 유의

성은 인정되지 않았다

2. MCD-diet는 mouse의 간장 중량을 유의성 있게 감소시켰지만, 대조군과 인진청간탕군 및 인진사령산군간의 변화에서 유의성은 인정되지 않았다.
3. 인진청간탕은 MCD-diet로 인한 ALP와 ALT의 상승을 억제하였고, 인진사령산은 total bilirubin, AST, ALT의 상승을 억제하였으나 유의성은 인정되지 않았다.
4. 인진청간탕과 인진사령산은 MCD-diet로 유발된 간조직의 지방축적과 섬유화 진행을 유의성 있게 억제하였다.
5. 인진청간탕과 인진사령산은 MCD-diet로 증가된 Collagen type Ia1, PDGFBR1, MMP2 유전자의 발현을 억제하였고, 감소된 ASMA, TGFb1, TIMP I 유전자의 발현을 증가시켰다. TIMP II 유전자는 MCD-diet 군에서 발현이 저하되었고 인진청간탕과 인진사령산의 투여로 더욱 저하되었다.

이상에서 인진청간탕과 인진사령산은 MCD-diet로 유발된 NASH 동물모델에서 간기능회복, 지방축적 및 섬유화 억제에 효과가 있음이 확인되었다. 따라서 인진청간탕과 인진사령산의 장기간 투여는 간세포 보호 및 지방과 콜라겐 침착 억제를 통한 NASH치료에 효과적일 것으로 사료되며, 추후 다양한 병태모델을 통한 효능검증과 치료기전에 관한 심도있는 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. 이동석, 박민재, 정인권, 권기태, 김세환, 조창민, 탁원영, 권영오, 김성국, 최용환, 배한익. 비알코올성 지방간염의 진단 및 간섬유화 정도의 예측인자. 대한내과학회지. 2004;67(3):232-231-40.
2. 진소영. 지방간. 대한간학회지. 2006;12(1):112-5.
3. 연종은. 비알코올성 지방간 질환의 임상적 의의.

가정의학회지. 2003;24:510-5.

4. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis dose not exhibit insulin resistance. J Hepatol. 2004; 40:47-51.
5. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. Mitochondrion. 2006;6:1-28.
6. 우홍정. 만성B형간염에 대한 인진청간탕의 효과. 제2회한중학술대회참가논문집. 1995. p. 18-53.
7. 이지현, 이장훈, 우홍정. 인진분획물이 인체간세포의 TGF-β1 induced apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;20:53-61.
8. 강우성, 김영철, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕이 HepG2 cell의 TNF-α 신호전달체계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(1):28-45.
9. 표임정, 이장훈, 우홍정. 인진사령산이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1999;22:119-40.
10. 고흥, 이장훈, 우홍정. 인진사령산 분획물이 간세포활성, 세포주기 및 Fas-Mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21:174-85.
11. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해서. 서울: 한국메디칼인덱스사; 1988.
12. 박중원. 지방간의 진단과 치료. 대한간학회지. 2001;7:64-70.
13. 강지현, 이상화, 이홍수, 조주연, 유병연. 성인 남성에서 비알코올성 지방간 질환과 대사증후군과의 관련성. 가정의학회지. 2003;25:746-53.
14. 김상진, 박중원, 김미경, 홍요한, 한성혁, 김재규 등. 비알코올성 지방간 환자에서 지방간염의 심화도를 예측할 수 있는 임상적 지표들. 대한간학회지. 2000;6(1s):16.
15. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clinic

- Proc. 1980;55:434-8.
16. 박도윤. 비알코올성 지방간질환과 알코올성 간 질환의 병리학적 감별진단. 대한간학회. single topic symposium. 2003;9(1s):71-7.
 17. 오희주, 최재원, 김국현, 이은주, 오현아, 이형철 등. 초음파로 진단된 지방간에서 알코올성 지방간과 비알코올성 지방간의 임상양상. 대한소화기학회 추계학술대회지. 2003;41:632.
 18. Andrew J. Lickteig, Craig D. Fisher, Lisa M. Augustine, and Nathan J. Cherrington. Genes of the Antioxidant Response Undergo Upregulation in a Rodent Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY*. 2007;219:216-20.
 19. Haruko Sugino, Naoki Kumagai, Sakiko Watanabe, Kyoko Toda, Osamu Takeuchi, Satoshi Tsunematsu, Shojiroh Morinaga, Kanji Tsuchimoto. Polaprezinc attenuates liver fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008.
 20. Chawla RK, Watson WH, Eastin CE, Lee EY, Schmidt J, McClain CJ. S-adenosylmethionine deficiency and TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *Am J Physiol*. 1998; 275:G125-9.
 21. 김진주. 인진청간당이 MHV-2로 유발된 마우스의 손상간에 미치는 영향. 경희대학교대학원. 1996.
 22. 강경태, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕가미방이 실험적 흰쥐의 간경변증에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1997;20:133-50.
 23. 홍상훈, 이장훈, 우홍정. 인진청간탕가미방이 간세포활성세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998;19:337-72.
 24. Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYPEI mediated oxidative stress induced collagen type1 expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999;30:987-96.
 25. Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol*. 1998; 29:836-47.
 26. Gresner AM. Cytokines and cellular cross talk involved in the activation of fat storing cells. *J Hepatol*. 1995;22:28-36.
 27. 박근철. Transforming Growth factor β 와 악성종양. *Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology News*. 1996;3:21-4.
 28. Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14, 643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2004;39: 1286-96.