

흰쥐의 알코올 유발성 간손상에 실비음(實脾飲)이 미치는 보호 효과

김범희

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 동의대학교 한의학연구소

The Protective Effects of *Silbi-um* Extract on the Alcoholic Liver Injury in Rats

Bum Hoi Kim

Department of Anatomy, College of Korean Medicine and Research Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Received: November 2, 2018
Revised: December 9, 2018
Accepted: December 11, 2018

Correspondence to: Bum Hoi Kim
Department of Anatomy, College of
Korean Medicine, Dong-Eui University,
52-57 Yangjeong-ro, Busanjin-gu,
Busan 47227, Korea
Tel: +82-51-850-7411
Fax: +82-51-853-4036
E-mail: bume@deu.ac.kr

Copyright © 2018 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: The objective of this study is to investigate the effects of *Silbi-um* (SBU) extract on the alcoholic fatty liver induced by EtOH administration for 8 weeks.

Methods: Male Sprague Dawley rats were used. All animals were randomly divided into 3 groups; Normal, EtOH and EtOH+SBU. The rats of EtOH group were daily treated with ethanol of 25% (v/v) for 8 weeks (n=10). EtOH+SBU group was orally treated with SBU water extract after ethanol administration (n=10). The rats of Normal group were treated with saline (n=10). After 8 weeks, the mean body weight, liver weight, and liver-body weight ratio were calculated. The serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of all groups were measured. The morphological alterations were observed using hematoxylin and eosin (H&E) and Oil Red O staining. Moreover, the alteration of tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were analyzed immunohistochemically.

Results: The histological data showed that liver sections from EtOH group displayed severe steatosis. SBU extract significantly inhibited the progression of the alcoholic liver injury. The increased serum level of ALT and AST induced by ethanol administration were decreased by SBU extract. Furthermore, SBU extract significantly decreased the liver concentrations of TNF- α .

Conclusions: SBU water extract attenuated the alcohol induced fatty liver by improving hepatic lipid metabolism via suppression of TNF- α protein. SBU could be effective in protecting the liver from alcoholic fatty liver.

Key Words: Alcoholic fatty liver, *Silbi-um*, Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

서론

지방간(fatty liver)이란 여러 원인에 의해 간 조직에 지질이 축적되어 지방방울(lipid droplet)을 함유한 간세포가 5% 이상을 넘게 되어 결국 간기능을 저하시키게 되는 질환을 말한다¹⁾. 지방간은 비만, 당뇨, 알코올 섭취 및 이상 지질혈증(dyslipidemia) 등에 의해 발생할 수 있다²⁾. 특히 알코올을 다량으로 장기간 섭취하게 되면 대사기능의 장애가 나타나고, 이에 따라 간에서의 지방산의 증가 및 중

성지방 합성이 증가하게 되어 알코올성 지방간(alcoholic fatty liver)이 발생하게 된다³⁾. 이러한 간에서의 지질 축적은 알코올성 간질환의 중요한 특징으로 질병의 초기 단계임을 나타내는데, 이후 간의 염증, 섬유화, 간경화증 및 간세포의 악성종양 등을 유발할 수 있다⁴⁾. 알코올에 의해 간손상의 가장 잘 알려진 기전은 free radical 형성에 따른 염증반응과 산화적 손상(oxidative stress)의 유발이다. 만성적인 알코올 섭취는 활성산소(reactive oxygen species)를 증가시키고, 막인지질과 지방단백질의 과산화를 일으킨

다⁵). 간의 쿠퍼세포(Kupffer cell)와 말초혈액의 단핵구에 의해 분비되는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β 및 IL-6는 알코올성 간질환의 세 가지 중요한 염증성 cytokine이다⁶). 특히 알코올성 간질환에 효과가 있는 약물들이 TNF- α 등의 염증성 cytokine의 수준을 낮춤으로써 치료 효과를 가지게 되는 것으로 밝혀졌다⁷). 이전 연구를 통해 TNF- α 는 알코올성 지방간에서도 발현이 뚜렷이 증가하는 것이 보고되었고⁸), TNF- α receptor의 인위적인 제거는 알코올성 지방간의 유발을 억제하는 것으로 밝혀졌다⁹). 즉 TNF- α 는 알코올에 의한 간에서의 지방성 병변에 중요한 역할을 한다.

실비음(實脾飲)은 <萬病回春>에 처음 기재된 처방으로¹⁰), 理氣, 健脾, 利濕하는 약물로 구성되어 있으며, ‘身重懶食, 肢體浮腫, 口中不渴, 二便不實’을 치료하는 효능을 가지고 있어 다양한 원인으로 발생하는 신장질환, 장질환 및 간질환에 사용된다¹¹). 실비음에 대한 이전 연구로는 Zucker rat의 비만 및 항산화에 대한 보호 효과¹²), gentamicin sulfate로 유발된 흰쥐의 급성 신부전에 미치는 보호 효과 등이 보고되었다¹³). 하지만 실비음에 대한 실험적 연구가 부족한 편이며, 특히 간의 알코올성 병변에 대한 영향에 관해서는 아직까지 연구가 이루어지지 않았다. 이에 본 연구는 실비음이 이전 연구¹²)에서 유전적 비만동물에서 산화적 손상을 억제함으로써 중성지방 및 총 콜레스테롤을 감소시키고 지질과산화물을 유의하게 감소시킨 점에 착안하여 알코올성 지방간 형성에도 보호 효과가 있을 것으로 사료되어, 알코올 섭취로 유발된 간에서의 지질합성에 실비음이 미치는 영향을 검증하였다. 이를 위해 흰쥐에 8주간 에탄올을 투여하여 알코올성 지방간을 유발하고 동시에 실비음 물추출물을 경구투여 한 후, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 등의 간기능 관련 지표들의 변화를 관찰하고 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 및 Oil Red O 염색을 시행하여 간세포의 해부조직학적 변화를 관찰하였다. 또한 간세포에서의 TNF- α 의 발현 변화를 면역조직화학염색법을 통해 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

본 연구에 사용된 실험동물은 Sprague-Dawley계 흰쥐 30마리로, (주)샘타코(Samtaco Bio Korea, Osan, Korea)에

서 구입하였으며 8주령, 약 200 g 전후의 수컷을 사용하였다. 실험에 사용된 흰쥐들은 온도 23~24°C, 습도 40~60%가 항상 유지되고 12시간 명/암 조명이 자동적으로 유지되는 사육실에서 관리되었다. 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 전체 기간 동안 무균 음료 및 사료를 자유롭게 공급하였다. 본 연구에서 진행된 모든 실험동물과 관련된 과정은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: R2018-006).

2. 약물의 제조

실비음의 구성약재는 (주)나눔제약(Namum Herb, Yeoung Cheon, Korea)에서 구입하였으며, 처방구성은 Table 1과 같다. 실험에 사용된 약물의 제조는 실비음 2첩 분량인 204 g을 증류수 2 L와 함께 둥근 플라스크에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압 농축하여 동결 건조시켜 물추출액기스 62.7 g을 얻었다. 투여량은 흰쥐 체중 10 g당 268.6 mg을 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

3. 실험군의 분리와 약물 투여

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 Normal, EtOH, EtOH+SBU 세 군으로 나누었다. 흰쥐에의 알코올성 간손상은 25%의 EtOH (Sigma-Aldrich Chem. Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 8주간 투여함으로써 유

Table 1. Herbal Composition of *Silbi-um* (SBU)

Herb name	Weight (g)
Atractylodis Rhizoma	8
Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	8
Magnoliae Cortex	8
Alismatis Rhizoma	8
Cyperis Rhizoma	8
Amomi Fructus	8
Aurantii Immaturus Fructus	8
Citri Pericarpium	8
Arecae Pericarpium	8
Aucklandiae Radix	8
Polla Cortex	8
Polyporus	8
Junci Medulla	6
Total amount	102

말하였는데, EtOH군, EtOH+SBU군에 5 mL/kg의 용량으로¹⁴⁾ 매일 오전 일정 시간에 1회 경구 투여하였다. Normal군에는 동일량의 생리식염수를 경구 투여하였다. EtOH 투여 30분 후에 EtOH+SBU군에는 실비음 물추출물을 1 mL의 투여량으로 경구 투여하였으며, EtOH군에는 같은 양의 생리식염수를 투여하였다.

4. 혈액생화학적 검사

8주 후 실험동물을 안락사시킨 후 심장 혹은 하대정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액을 냉장고에 2시간 저장 후 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 채취한 혈청 내 AST, ALT의 수치를 측정하였다.

5. 체중 측정 및 간의 중량 측정

8주간의 실험 기간 동안 매일 오전 정해진 시간에 실험동물의 체중을 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 안락사 직전에 체중을 측정하였다. 부검을 통해 실험동물의 간을 분리하여 채취하고 중량을 측정하였다. 이후 간 조직은 -50°C의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 -80°C에서 보관하였다.

6. 간 조직의 해부조직학적 관찰

각 실험군의 동결보관된 간 조직 중앙 부분의 동일한 일정 부위를 떼내어, 8 μm 두께로 냉동절편하였다. 이후 H&E 염색법과 Oil Red O 염색을 시행 후, 현미경하에서 관찰하였다. 염색된 간 조직은 사진 촬영 후 영상분석용 Axiovision LE software (ver. 4.2; Carl Zeiss Vision Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

7. 면역조직화학염색(immunohistochemistry)

자유부유법(free-floating)을 사용하여 면역조직화학염색을 시행하였으며, 일차항체(primary antibody)는 anti-TNF-α (ab6671, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; ABcam)로 phosphate-buffered saline (PBS)와 Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chem. Co., St. Louis, MO, USA)을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, ABC Vectastain Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용한 avidin-biotin immunoperoxidase의 방법에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다. 면역반응을 정량화하기 위해 동일한

일정 면적 내에 명확하게 적갈색으로 염색된 세포를 면역양성반응으로 구분하고 세포수를 측정하여 수치화하였다.

8. 통계학적 분석

본 실험에서 얻은 모든 자료는 Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows (version 10.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석하였다. 세 실험군에서 측정된 모든 자료는 analysis of variance (ANOVA) 분석 후 사후검정을 시행하고, 두 군씩 Student's *t*-test를 사용하여 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 의 유의수준으로 검증하였다. 결과의 모든 값은 평균±표준오차(mean±standard error)로 표기하였다.

결과

1. 알코올 투여 후 체중 및 개체의 변화

8주간의 실험 기간 동안 모든 실험군에서 실험동물의 사망은 발생하지 않았다. 각 실험군에서의 체중 변화를 살펴보면, EtOH군과 EtOH+SBU군에서 Normal군에 비해 상대적으로 체중이 감소되는 경향이 나타났다(Fig. 1). 8주 후의 최종적인 체중을 측정한 결과에서는 Normal군에서 425.4±8.0 g, EtOH군이 376.2±8.7 g, EtOH+SBU군에서 382.5±7.6 g으로 관찰되어, EtOH군과 EtOH+SBU군 모두에서 Normal군에 비해 평균 체중이 유의하게 감소되었으며 ($P < 0.01$), EtOH군과 EtOH+SBU군의 비교에서는 EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 평균 체중이 약간 회복되었으나, 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다.

2. 간손상의 생화학적 지표

8주 후 각 군의 실험동물로부터 채취한 혈액에서 혈청 AST, ALT의 수준을 비교 분석한 결과, AST의 경우 Normal군에서 111.1±3.3 IU/L로 측정된 반면, EtOH군에서 180.5±3.6 IU/L로 급격한 상승을 나타냈다(Table 2, $P < 0.01$). 한편, EtOH+SBU군에서는 167.8±2.8 IU/L로 측정되어 EtOH군에서와 마찬가지로 Normal군에 비해 유의하게 증가되었으나(Table 2, $P < 0.01$), EtOH군과의 비교에서는 유의하게 감소되었다(Table 2, $P < 0.05$).

ALT의 경우에서도 Normal군이 27.4±0.7 IU/L, EtOH군이 38.5±0.6 IU/L로 측정되어 EtOH군에서 Normal군에 비해 유의하게 증가되었으며(Table 2, $P < 0.01$), EtOH+SBU군에서는 36.6±0.7 IU/L로 측정되어 Normal군에 비해 유의하

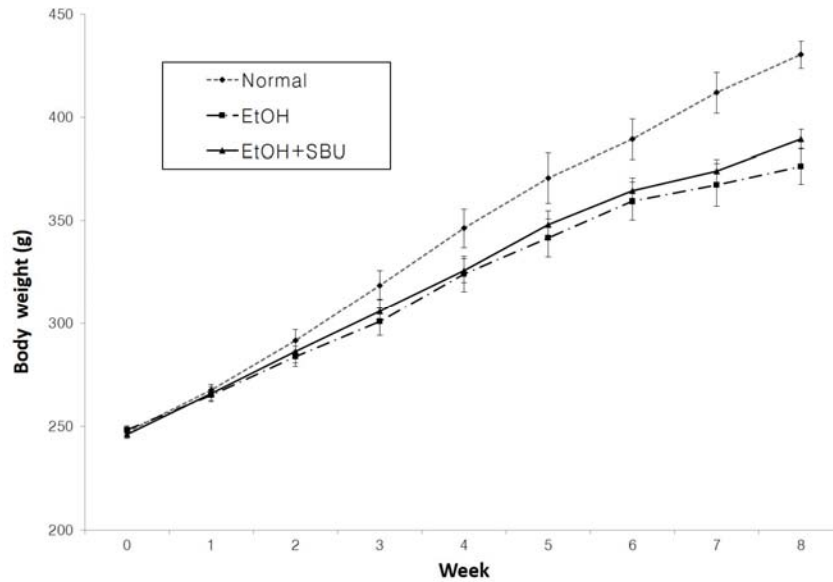


Fig. 1. The changes of mean body weights of rats during the 8 weeks. The mean body weight of both EtOH and EtOH+*Silbi-um* (SBU) groups were decreased as compared with Normal group. There were no significant differences in the mean body weights between EtOH and EtOH+SBU groups.

Table 2. Blood Serum Chemistry Values of Rats in Normal, EtOH and EtOH+*Silbi-um* (SBU) Groups

Group	Normal	EtOH	EtOH+SBU
AST (IU/L)	111.1±3.3	180.5±3.6 [†]	167.8±2.8 [†]
ALT (IU/L)	27.4±0.7	38.5±0.6 [†]	36.6±0.7 [†]
AST/ALT ratio	4.05	4.69	4.58

Data were expressed as mean±standard error and were analysed by the Student's *t*-test. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase. [†]P<0.05 compared with Control group; [‡]P<0.01 compared with Normal group.

게 증가되었다(Table 2, P<0.01). 하지만 EtOH군과 EtOH+SBU군 간의 비교에서는 EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 유의하게 감소되었다(Table 2, P<0.05). AST/ALT 비율의 비교에서는 Normal군에서 4.05, EtOH군에서 4.69로 계산되어 EtOH군이 Normal군에 비해 증가되었으며, EtOH+SBU군에서는 4.58로 측정되어 EtOH군에 비해 상대적으로 감소되는 것으로 관찰되었다.

3. 간의 중량 변화

8주 후 각 실험군 흰쥐의 간을 적출하여 무게를 측정하여 비교하고, 체중 대비 중량으로 환산하여 변화를 관찰하였다. 그 결과, 간의 평균 무게는 Normal군에서 18.2±0.3 g, EtOH군에서는 15.5±0.3 g으로 측정되어 유의하게 감소되

Table 3. Changes in Body Weight and Liver-body Weight Ratio of Rats in Normal, EtOH and EtOH+*Silbi-um* (SBU) Groups

Group	Normal	EtOH	EtOH+SBU
Liver weight (g)	18.2±0.3	16.6±0.3 [†]	17.5±0.3 [‡]
Liver-body weight ratio (%)	4.23±0.11	4.42±0.08	4.49±0.11

Data were expressed as mean±standard error. [†]P<0.05 compared with Control group; [‡]P<0.05 compared with Normal group; [‡]P<0.01 compared with Normal group.

었다(Table 3, P<0.01). EtOH+SBU군에서는 16.4± 0.2 g으로 측정되어, Normal군에 비해 유의한 중량감소가 관찰되었으나(Table 3, p<0.05), EtOH군에 비해서는 무게 감소의 회복이 확인되었다(Table 3, P<0.05). 체중에 대한 간 중량의 비율로 환산하여 계산한 간-체중 비의 결과에서는 Normal군에서 4.23±0.11%, EtOH군이 4.14±0.12%, EtOH+SBU군에서 4.22±0.08%로 측정되어, EtOH군과 EtOH+SBU군에서 모두 Normal군에 비해 증가되었고, EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 약간 더 증가하였으나 세 군 간에 통계적인 유의성은 확인되지 않았다(Table 3).

4. 간의 해부조직학적 변화

적출된 간 조직을 8 μm 두께로 냉동절편하여 H&E 염색법을 시행 후 현미경하에서 관찰한 결과, Normal군은

정상적인 간 조직의 형태를 나타낸 반면, EtOH군에서는 8주간의 알코올 투여로 인해 간 조직의 괴사 및 지방방울 (fat droplet)의 형성을 뚜렷이 관찰할 수 있었다. EtOH+SBU 군에서도 지방방울의 형성이 관찰되었으나 EtOH군에 비해 그 크기와 수가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). Oil Red O 염색을 시행한 결과에서도 EtOH군과 EtOH+SBU군에서 Normal군에 비해 간 조직으로의 지질 축적(lipid accumulation)이 상대적으로 많이 관찰되었으나, EtOH+SBU군에서 EtOH군에 비해 현저히 줄어든 것이 확인되었다(Fig. 3).

5. 간 조직에서의 TNF- α 의 발현 변화

면역조직화학염색법을 통하여 TNF- α 에 대한 면역반응을 관찰한 결과, Normal군에서는 TNF- α 의 면역반응이 거의 발견되지 않았으나 알코올을 투여한 EtOH군에서는

Normal군에 비해 면역반응이 뚜렷이 증가되는 것이 관찰되었다. EtOH+SBU군에서도 면역반응이 증가되었으나 EtOH군에 비교해서는 상대적으로 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

현미경을 통해 확인된 TNF- α 의 발현을 객관적으로 수치화하기 위하여 일정 면적에서 양성반응을 보인 세포의 개수를 측정된 결과에서는, Normal군에서 양성반응세포수가 4.9 ± 0.9 개/ $1.2 \times 10^5 \mu m^2$ 인 반면, EtOH군에서는 45.7 ± 3.1 개/ $1.2 \times 10^5 \mu m^2$ 로 측정되어 Normal군에 비해 유의하게 증가되었다($P < 0.01$). EtOH+SBU군에서는 34.6 ± 3.1 개/ $1.2 \times 10^5 \mu m^2$ 로 관찰되어 EtOH군과 마찬가지로 Normal군에 비해 유의하게 증가되었으나($P < 0.01$), EtOH군에 비해서는 면역 양성반응 세포수가 유의하게 감소되었다(Fig. 4, $P < 0.05$).

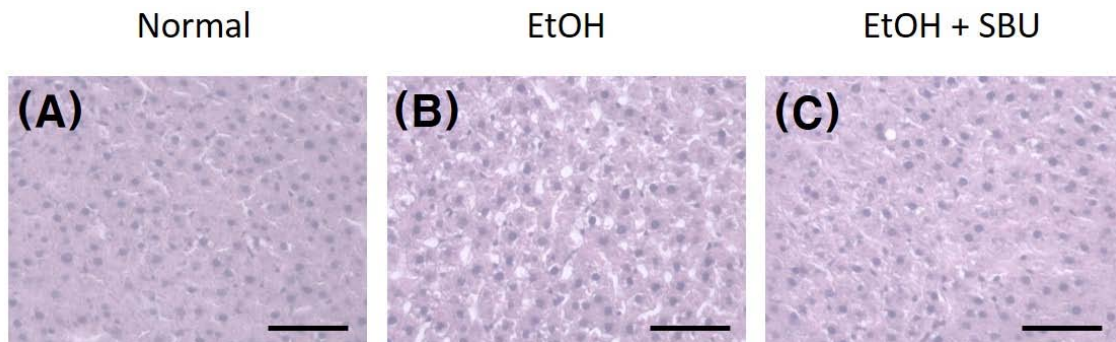


Fig. 2. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of liver tissue from Normal, EtOH, and EtOH+*Silbi-um* (SBU) groups. The normal histological structures of hepatocytes (A) were observed in Normal group. The significant histological alterations such as ballooning, fatty and hydropic degeneration were found in EtOH group (B) and the histological changes were ameliorated in EtOH+SBU group (C). Magnification: $\times 200$, Scale bar= $50 \mu m$.

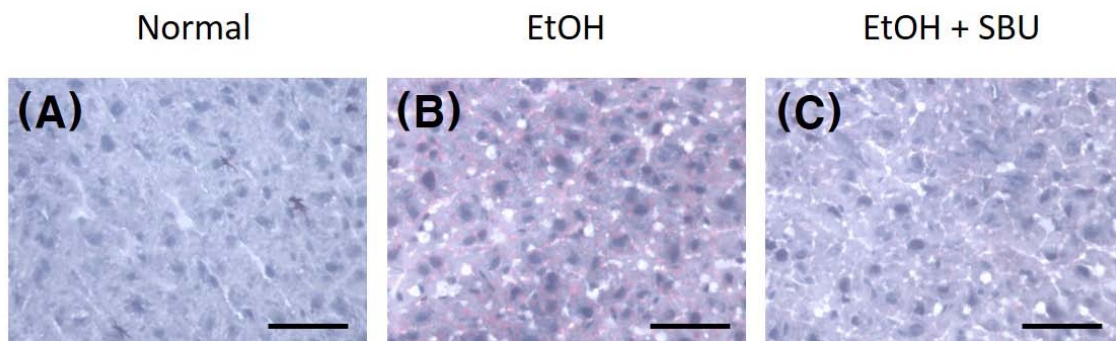


Fig. 3. Oil Red O staining of liver tissue from Normal, EtOH, and EtOH+*Silbi-um* (SBU) groups. No lipid accumulation was observed in Normal group (A). Whereas, EtOH group (B) showed the significant accumulation of lipids, as indicated by an increased number of red hepatocytes when compared with Normal group. EtOH+SBU group (C) demonstrated significantly decreased lipid infiltration compared with EtOH group. Magnification: $\times 400$, Scale bar= $100 \mu m$.

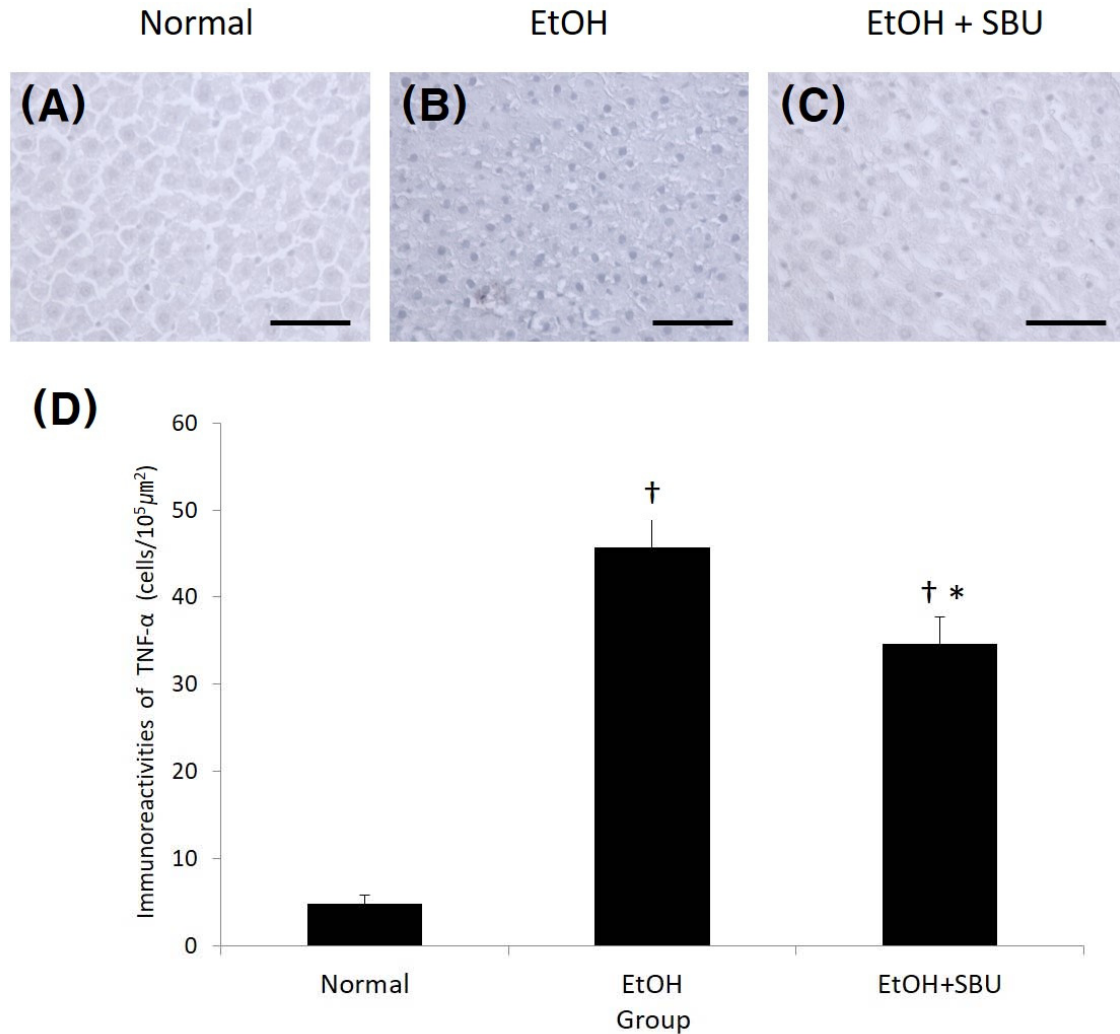


Fig. 4. Immunohistochemical staining for tumor necrosis factor- α (TNF- α) in liver sections from Normal, EtOH, and EtOH+SBU groups. TNF- α expressions were hardly observed in the liver tissue of Normal group (A). EtOH group (B) showed the increased level of TNF- α immunoreactivity. The expressions of TNF- α protein in EtOH+SBU group (C) were decreased as compared with EtOH group. Mean number of TNF- α positive cells counted (D). Data were expressed as mean \pm standard error. Magnification: $\times 200$, Scale bar=50 μ m. † P<0.05 compared with EtOH group; * P<0.01 compared with Normal group.

고찰

실험동물에 간의 알코올성 손상을 유발하는 방법은 여러 가지가 존재하는데^{14,18}, 일반적으로 20% 이상의 에탄올을 8주 이상 섭취할 경우 간에 알코올성 병변이 나타나는 것으로 보고되었다^{14,18}. 본 연구에서는 흰쥐에 25%의 에탄올을 8주 동안 매일 일정한 시간에 경구투여 함으로써 간의 알코올성 지방변증을 유도하였다. 알코올을 장기간 섭취할 경우 영양불균형으로 인해 체중이 감소되는 것으로 알려졌는데¹⁹, 본 연구에서도 Normal군에 비해 에탄올을

경구 투여한 EtOH군과 EtOH+SBU군에서 전반적으로 체중이 감소되었으며, 8주 후에는 두 군 모두 Normal군에 비해 유의하게 감소되었다. EtOH군과 EtOH+SBU군의 비교에서는 EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 평균 체중이 약간 회복되었으나, 유의한 차이는 없었다. 따라서 실비음의 투여는 알코올 섭취로 인한 체중 감소에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

간손상의 진단에 있어 ALT와 AST는 중요한 지표로 활용되는데, 일반적으로 알코올성 지방간의 경우 AST가 ALT보다 높으며, AST/ALT의 비율이 상승하는 것으로 알

려졌다^{20,21}). 본 연구에서는 알코올 섭취로 인한 간손상과 그에 대한 실비음의 영향을 살펴보기 위하여 혈청 내 ALT와 AST 효소의 농도를 측정된 결과, 에탄올을 8주간 투여한 EtOH군과 EtOH+SBU군에서 Normal군에 비해 ALT와 AST의 뚜렷한 상승이 관찰되었다. EtOH군과 EtOH+SBU군의 비교에서는 EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 ALT와 AST 수치의 상승이 모두 유의하게 억제되었다. 또한 AST/ALT의 비율에 있어서도, EtOH군과 EtOH+SBU군 모두 Normal군에 비해 증가되었으나, EtOH군과 EtOH+SBU군의 비교에서는 EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 상대적으로 감소되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 실비음이 장기간의 알코올 섭취로 인한 ALT와 AST의 증가 및 AST/ALT의 상승을 억제시키는 효과가 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

오랜 기간 알코올을 섭취했을 때 가장 먼저 나타나는 변화 중 하나는 간에서의 지방 축적, 즉 지방간 발생이다. 이러한 알코올성 지방간의 형성에 있어 중성지방(triglyceride) 생성의 증가가 중요한 역할을 하게 되는데²², 간에서의 지방 축적으로 인해 상대적으로 간의 실질조직이 감소하게 되면 간의 전체 무게도 감소하는 것으로 알려졌다²³. 본 연구에서도 8주간 알코올 투여 후 실험동물의 간을 적출하여 무게를 측정된 결과, 에탄올을 투여한 EtOH군과 EtOH+SBU군 모두에서 Normal군에 비해 간의 평균 무게가 유의하게 감소되었다. EtOH군과 EtOH+SBU군의 비교에서는 실비음을 투여한 EtOH+SBU군에서 EtOH군에 비해 간 중량의 감소가 유의하게 회복된 것을 확인할 수 있었다. 체중에 대한 간의 상대적 무게를 환산한 간-체중 비의 비교에서는 알코올을 투여한 EtOH군과 EtOH+SBU군에서 Normal군에 비해 간-체중 비가 증가되었으며, EtOH+SBU군과 EtOH군의 비교에서는 EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 간-체중 비가 좀 더 증가되었다. 이러한 결과를 통해 실비음 투여는 알코올 섭취로 인한 간의 무게 감소에 유의한 방어효과가 있음을 알 수 있다.

알코올에 의한 간손상은 초기에 간에서의 지방방울(fat droplet)의 생성으로 나타나는데, 축적된 지방산(fatty acid)들은 간에 독성으로 작용하게 된다^{2,24}). 따라서 알코올 섭취로 인한 간에서의 지방 축적은 간의 염증, 섬유화, 간경화증 및 간세포의 악성종양 등으로 이어질 수 있는 간질환의 초기 단계를 의미하게 된다⁴). 본 연구에서 에탄올 투여 후 간세포의 조직병리학적 변화를 관찰하기 위해 H&E

염색을 시행하였다. 그 결과, 8주간 에탄올을 투여한 EtOH군에서 Normal군에 비해 간 조직에서 염증세포 침윤과 간 조직 괴사 및 지방방울(fat droplet)의 형성이 뚜렷이 관찰되었다. 8주간의 에탄올 투여와 함께 실비음 물추출물을 투여한 EtOH+SBU군에서도 EtOH군과 비슷한 양상의 조직학적 변화가 관찰되었으나, EtOH군에 비해 현저히 감소되었다. 간 조직에 축적된 지방 함량을 확인하기 위해 시행한 Oil Red O 염색에서도 EtOH군에서 Normal군이 비해 간 조직으로의 지질침윤이 뚜렷이 관찰되었다. EtOH+SBU군에서도 지질침윤이 관찰되었으나, EtOH군에 비해 현저히 감소된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 실비음 투여가 알코올 섭취로 인한 간세포의 병리조직학적 변화, 특히 지방방울의 형성을 억제하여 간의 지방 변성을 감소시키는 효과가 있음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

알코올성 지방간의 병리기전에는 다양한 요소들이 관여하며 발생 과정에서 서로 영향을 미치며 복잡한 과정을 거치게 된다^{3,25}). 활성산소종(reactive oxygen species), 장유래내독소(gut-derived endotoxin), TNF- α 와 같은 adipocytokine들은 알코올로 인한 간손상과 초기의 지방 변성을 일으키는 주요 원인이 된다²⁶). 특히 TNF- α 는 여러 간질환에서 중요한 매개체로서의 역할을 하며 간손상이 유발될 경우 수치가 증가하는 것으로 보고되었다²⁷). 알코올로 인한 지방간 형성에도 이러한 TNF- α 가 핵심적인 역할을 수행하게 되는데, TNF- α 는 간에서의 콜레스테롤, 지방산 및 중성지방을 합성하는 sterol regulatory element-binding protein의 활성을 촉진시킴으로써 간의 지방 변성을 유발하는 것으로 알려졌다²⁸). 알코올성 지방간에 대한 역학 연구에서 알코올 섭취량과 혈청 TNF- α 의 농도 간에 서로 상관관계가 있음이 밝혀졌으며²⁹), 동물을 이용한 실험 연구에서도 장기간의 알코올 섭취 후에 TNF- α 가 증가하는 것으로 확인되었다^{18,30}). 본 연구에서는 에탄올 투여에 따른 TNF- α 의 발현 변화에 실비음이 미치는 영향을 확인하기 위해 면역조직화학염색법을 통해 관찰하였다. 그 결과, 8주간 에탄올을 투여한 EtOH군에서 Normal군에 비해 TNF- α 에 대한 면역반응이 뚜렷이 증가하는 것이 관찰되었다. 면역반응을 정량화하기 위해 일정 면적에서의 TNF- α 에 대해 양성반응을 보인 세포수를 측정된 결과에서도 EtOH군은 Normal군에 비해 면역 양성 세포수가 유의하게 증가되었다. 이러한 결과는 실험동물에 8주간의 알코올 투여 후 간세포에서의 TNF- α 의 발현이 유의하게

증가하였다는 이전의 연구와도 일치하는 것이다¹⁸⁾. 한편, EtOH+SBU군에서도 Normal군에 비해 TNF- α 의 면역반응이 증가하였으나, EtOH군에 비해서 발현이 감소된 것으로 관찰되었다. 면역반응을 정량화하여 측정된 결과에서도 EtOH+SBU군이 EtOH군에 비해 면역 양성반응 세포 수가 유의하게 감소되었다. 이러한 결과들을 통해 실비음 물추출물의 투여는 알코올 섭취로 인한 간에서의 TNF- α 의 증가를 유의하게 억제시키는 것으로 확인되었으며, 실비음은 알코올 섭취로 인한 간손상 및 지방간 생성 과정에서 유의한 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

종합하면, 이전 연구를 통해 실비음이 비만을 유의하게 억제하고 항산화 효능을 가지고 있음이 보고¹²⁾되었으며, 실제 임상에서도 비만을 치료하기 위한 처방으로 사용¹¹⁾되고 있음에도 불구하고 기존 연구는 주로 신장질환에 관한 것이 대부분이었다. 따라서 본 연구는 임상에서 알코올성 지방간 질환에 대해 실비음을 활용할 수 있는 근거 자료를 마련한 것이라 할 수 있다.

다만, 본 연구에서는 알코올로 인한 간손상 발생 기전에 있어 TNF- α 에 미치는 영향만을 확인하였으나 추후 지속적인 연구를 통해 다른 기전에 미치는 영향에 대해서도 검증할 필요가 있다. 또한 이미 알코올성 간손상에 유의한 보호 효과가 있는 것으로 알려진 silymarin³¹⁾ 등과 같은 약제들과의 효능 비교도 이루어진다면 좀 더 임상에 적극적으로 활용 가능하리라 생각된다. 나아가, 비만, 스트레스 등으로 인한 비알코올성 지방간뿐 아니라 여러 가지 원인에 의해 발생하는 간손상에 실비음이 미치는 효과에 대해서도 검증할 필요가 있다고 사료된다.

결론

본 연구는 알코올 투여로 유발된 지방간에 대한 실비음의 영향을 검증하기 위하여 흰쥐에 25% EtOH을 8주간 경구 투여하여 지방간 형성을 유발하고 동시에 실비음 물추출물을 경구 투여한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. 실비음은 8주간의 알코올 섭취로 인한 흰쥐의 체중 감소에는 유의한 영향을 미치지 않았으나, 알코올로 인한 간의 무게 감소를 유의하게 억제하였다. 간-체중 비의 변화에는 유의한 변화를 나타내지 않았다. 또한 알코올 섭취로 인한 AST와 ALT의 상승을 유의하게 억제시켰으며, AST/ALT 비율의 상승을 억제하였다. 간세포의 해부조직

학적 변화에 있어서도 실비음 물추출물은 알코올 섭취로 인한 간 조직의 괴사, 지방방울의 형성과 같은 병리적 변화를 억제시켰다. 이러한 실비음의 알코올성 지방간에 대한 보호 효과는 알코올로 인한 간세포에서의 지방 변성에 중요한 매개체인 TNF- α 의 발현을 효과적으로 억제시키기 때문인 것으로 사료된다. 이와 같은 결과로 실비음은 알코올 섭취로 인한 간에서의 지방 축적에 유의한 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

References

1. Okumura T. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem*. 2011 ; 67(4) : 629-36.
2. Carr RM, Ahima RS. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Exp Cell Res*. 2016 ; 340(2) : 187-92.
3. Liu J. Ethanol and liver: recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(40) : 14672-85.
4. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(36) : 12945-55.
5. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(47) : 17756-72.
6. Chen YL, Peng HC, Hsieh YC, Yang SC. Epidermal growth factor improved alcohol-induced inflammation in rats. *Alcohol*. 2014 ; 48(7) : 701-6.
7. Suk KT, Kim MY, Baik SK. Alcoholic liver disease: treatment. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(36) : 12934-44.
8. Lin HZ, Yang SQ, Zeldin G, Diehl AM. Chronic ethanol consumption induces the production of tumor necrosis factor-alpha and related cytokines in liver and adipose tissue. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 ; 22(5) : 231-7.
9. Ji C, Deng Q, Kaplowitz N. Role of TNF-alpha in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology*. 2004 ; 40(2) : 442-51.
10. Gong YX. Wan Bing Hui Chun. 1st ed. Taipei : Greater China Book Company. 1983 : 174.
11. Wang YY, Li YX. Clinical experience of Shi pi yin. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*. 2011 ; 18(6) : 83-4.
12. Jeon GT, Keum DH, Lee MJ. The effects of Silbi-um (Shipi-yin) on obesity and antioxidant activities in Zucker rat. *J Korean Med Rehabil*. 2003 ; 13(2) : 69-85.
13. Lim HW, Kang SB, Kim MR. Effects of Silbieum and Lieum Jeon on rats with acute renal failure induced by

- gentamicin sulfate. *The Journal of East-West Medicines*. 1993 ; 18(2) : 5-20.
14. Kim JJ, Seo BI, Choi HS, Kim SM, Woo CH, Koo JS, et al. Preventive effects of Daekumeumja on fatty degeneration of liver and immunosuppression induced by alcohol. *J Korean Med*. 2010 ; 16(2) : 167-79.
 15. Ma Z, Zhang Y, Li Q, Xu M, Bai J, Wu S. Resveratrol improves alcoholic fatty liver disease by downregulating HIF-1 α expression and mitochondrial ROS production. *PLoS One*. 2017 ; 12(8) : 1-11.
 16. Altavilla D, Marini H, Seminara P, Squadrito G, Minutoli L, Passaniti M, et al. Protective effects of antioxidant raxofelast in alcohol-induced liver disease in mice. *Pharmacology*. 2005 ; 74(1) : 6-14.
 17. Augustyniak A, Waszkiewicz E, Skrzydlewska E. Preventive action of green tea from changes in the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol. *Nutrition*. 2005 ; 21(9) : 925-32.
 18. Zhou J, Zhang J, Wang C, Qu S, Zhu Y, Yang Z, et al. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) attenuates alcohol-induced liver injury in rats by alleviating oxidative stress and inflammatory response. *Exp Ther Med*. 2018 ; 15(1) : 166-72.
 19. Tayie FA, Beck GL. Alcoholic beverage consumption contributes to caloric and moisture intakes and body weight status. *Nutrition*. 2016 ; 32(7-8) : 799-805.
 20. Tang L, Yang F, Fang Z, Hu C. Resveratrol ameliorates alcoholic fatty liver by inducing autophagy. *Am J Chin Med*. 2016 ; 44(6) : 1207-20.
 21. Tan P, Liang H, Nie J, Diao Y, He Q, Hou B, et al. Establishment of an alcoholic fatty liver disease model in mice. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2017 ; 43(1) : 61-8.
 22. Bi L, Jiang Z, Zhou J. The role of lipin-1 in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. *Alcohol Alcohol*. 2015 ; 50(2) : 146-51.
 23. Singh S, Osna NA, Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: a review. *World J Gastroenterol*. 2017 ; 23(36) : 6549-70.
 24. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV Jr. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 ; 14(6) : 343-55.
 25. Ikura Y, Caldwell SH. Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 ; 8(8) : 8699-708.
 26. Purohit V, Gao B, Song BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 ; 33(2) : 191-205.
 27. Eguchi A, Wree A, Feldstein AE. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol*. 2014 ; 60(5) : 1063-74.
 28. Donohue TM Jr. Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J Gastroenterol*. 2007 ; 13(37) : 4974-8.
 29. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. 2004 ; 34(1) : 9-19.
 30. Yang W, Huang L, Gao J, Wen S, Tai Y, Chen M, et al. Betaine attenuates chronic alcohol-induced fatty liver by broadly regulating hepatic lipid metabolism. *Mol Med Rep*. 2017 ; 16(4) : 5225-34.
 31. Hsieh YL, Yeh YH, Lee YT, Huang CY. Protective effects of Cholestin on ethanol induced oxidative stress in rats. *J Sci Food Agric*. 2015 ; 95(4) : 799-808.