대한한의학 방제학회지 제26권 제2호
Herbal Formula Science
2018;26(2):113~122
pISSN 1229-1218, eISSN 2288-5641 https://doi.org/10.14374/HFS.2018.26.2.113
Official Journal of The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
Available at http://www.formulastudy.com HFS

Original Article / 원저

茵蔯四苓散이 흰쥐의 알콜성 지방간에 미치는 영향

김범회*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 동의대학교 한의학연구소

The Effects of *Injinsaryung-san* on Rat with Alcoholic Fatty Liver

Bum Hoi Kim*

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

ABSTRACT

Objectives : Alcoholic fatty liver is an early and reversible consequence of excessive alcohol consumption. The initial hepatocyte cell death stimulates subsequent inflammatory responses, leading to further liver injury and fibrosis. The objective of this study is to investigate the effects of *Injinsaryung-san* extract on the alcoholic fatty liver by chronic EtOH administration.

Method : Male Sprague Dawley rats were used in this study. All animals were randomly divided into Normal group, treated with saline (n=10); EtOH group, treated with ethanol (n=10); EtOH+IS group, treated with ethanol+*Injinsaryung-san* extract (n=10). For oral administration of ethanol in Control and Sample group, the ethanol was dissolved in distilled water in concentrations of 25%(v/v). Throughout the experiment of 8 week, the rats were allowed free access to water and standard chow. Sample group were administrated by *Injinsaryung-san* extract daily for 8 weeks.

Results : The levels of hepatic marker such as aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were altered. Histopathological changes were reduced and the expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α) was markedly attenuated by *Injinsaryung-san* extract.

Conclusion : These data suggest that *Injinsaryung-san* extract could be effective in protecting the liver from alcoholic fatty liver. The hepatoprotective mechanisms of *Injinsaryung-san* may be related to attenuation of TNF-α protein, as well as to the inhibition of inflammatory response in the liver. Therefore, *Injinsaryung-san* can be a candidate to protect against alcoholic fatty liver.

ⓒ 2018 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
This paper is available at http://www.formulastudy.com which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Key words : Alcoholic fatty liver, *Injinsaryung-san*, TNF-α, inflammatory response.

Ⅰ. 서론

지방간(fatty liver)은 간질환의 초기 단계로 간의 비대화나 진행정도에 따라 세포의 괴사 또는 간경화 등으로 발전하기도 한다. 지방간에서는 간세포내에서 지방의 양이 증가하며 간의 무게에서 지방이 차지하는 비율이 약 5%가 넘게 되며, 간에서의 지방산의 합성과 분비의 균형이 깨져서 발생하는 것으로 알려져 있다[1]. 지방간은 크게 비알콜성과 알콜성으로 분류되는데, 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver)은 비만, 스테로이드, 항경련제 등의 약물, 영양실조, 당뇨병 등 다양한 원인으로 발생할 수 있으며, 알콜성 지방간(alcoholic fatty liver)은 주로 과도한 음주로 인해 발생한다[2]. 알콜성 지방간은 알콜성 간질환(alcoholic liver disease)의 초기 단계이며, 간세포에 중성지방(triglycerides)의 축적을 특징으로 하며 알콜성 지방 간염(alcoholic steatohepatitis)과 알콜성 간경변증(alcoholic liver cirrhosis)으로 진행되기도 한다[3]. 알콜성 지방간의 원인은 산화적 손상(oxidative stress) 및 지질대사의 장애와 관련 있으며, 또한 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor-α (TNF-α)가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려졌다[4]. 알콜을 만성적으로 섭취하게 되면 TNF-α에 의해 간에서의 지방산(fatty acid) 축적이 촉진되는 것으로 밝혀졌다[5]. 즉, 알콜의 지속적인 섭취는 장막(intestinal membrane)의 투과성을 증가시키고, 지질다당류(lipopolysaccharide) 등의 혈액 내 독소들의 농도를 증가시키게 된다. 이에 따라 간의 Kupffer cell들이 활성화되고 염증성 cytokine 생성에 대한 반응이 증가하게 된다. 결국 만성적인 알콜 섭취는 TNF-α에 의하여 간세포의 손상을 유발하게 된다[6].

인진사령산(茵蔯四苓散)은 한의학 임상에서 만성 간질환 치료에 자주 사용되는 처방으로, 청열리습(淸熱利濕), 건비화습(健脾化濕)하는 효능이 있어 간염, 지방간, 간경변 등에 기본방으로 활용된다[7]. 인진사령산에 대한 실험적 연구로는 간세포 활성 증가 효과[8]와 CCl_4로 유발된 간손상과 지방간 발생에 대한 효과[9], 비알콜성 지방간염에 대한 보호효과[10] 등이 보고되었으며, 임상적 연구에서는 인진사령탕과 대금음자(對金飮子)의 합방인 청간해주탕(淸肝解酒湯)이 알콜성 지방간에 유의한 치료효과[11]가 있는 것으로 보고되었다. 이처럼 인진사령산은 다양한 원인으로 발생하는 여러 간질환에 효과가 있는 것으로 알려졌는데, 아직 알콜로 인해 발생되는 지방간 질환에 대한 효능에 대해서는 실험적 연구가 부족한 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구의 목적은 인진사령산 추출물이 만성적인 알콜투여에 의해 유발된 간손상과 지방간 발생에 대한 보호효과를 검증하기 위한 것이며, 이를 위해 흰쥐에 에탄올을 8주간 경구 투여하여 알콜성 지방간을 유발하고 간기능 관련 인자들의 변화와 간세포의 해부조직학적 변화 및 TNF-α의 발현 변화에 대한 인진사령산의 효능을 관찰하였다.

Ⅱ. 실험방법

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코 (경기도, 대한민국)에서 구입한 8주령, 약 200 g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 30마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 23~24℃, 습도 40~60 %, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

본 연구의 모든 과정은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: R2016-029).

2. 약물의 제조와 실험군의 분리

본 연구에 사용된 인진사령산의 구성은 Table 1과 같다[10]. 구성 약물들은 ㈜나눔제약에서 구입하여 선별작업을 거쳐, 인진사령산 2첩 분량인 220 g을 증

* Corresponding author : Bum Hoi Kim. Department of Korean Medicine, Dong-eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.
Tel: +82-51-850-7411, Fax: +82-51-850-7435, E-mail: bume@deu.ac.kr
•Received : April 18, 2018 / Revised : May 18, 2018 / Accepted : May 25, 2018

류수 2L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압 농축하여 동결 건조시켜 물추출엑기스 65.9 g을 얻었다. 투여량은 체중 70kg의 사람이 하루 3첩 복용하는 것으로 가정하여 복용량을 계산해 흰쥐 체중 100 g당 0.47 mg을 음용수에 녹여 경구 투여하였다. 동결건조 시료는 실험기간 동안 동의대학교 해부학교실에서 -20℃에 보관하였다(HT-001).

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 Normal, EtOH, EtOH+IS 세 군으로 분리하였으며, 물과 사료는 모든 군에서 전체 실험기간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

Table 1. Herbal Composition of *Injinsaryung-san(Yinchensiling-san)*

Herb name	Scientific name	weight(g)
Injin (茵蔯)	*Artemisia capillaris* Thunberg	50
Taeksa (澤瀉)	*Alisma orientale* Juzepzuk	24
Baekchul (白朮)	*Atractylodes macrocephala* Koidzumi	12
Baekbokryung (白茯苓)	*Poria cocos* Wolf	12
Jeoryung (豬苓)	*Polyporus umbellatus* Fries	12
Total amount		110

3. 만성 알콜성 손상의 유발과 약물투여

흰쥐에서의 만성 알콜성 간손상은 25%의 EtOH (Sigma-Aldrich Chem. Co., St. Louis, Missouri, USA) 용액을 5ml/kg, bw/day의 수준으로[12], 8주간 매일 오전 일정한 시간에 경구 투여함으로써 유발시켰다. EtOH군, EtOH+IS군의 모든 실험동물에 EtOH을 경구투여 하였으며, Normal군에는 동일량의 생리식염수를 투여하였다. EtOH 투여 후 30분 후에 EtOH+IS군에는 인진사령산 추출물을, EtOH군에는 동일량의 생리식염수을 경구투여하였다.

4. 혈액생화학적 검사

실험 개시 8주후 실험동물을 안락사 시킨 후 심장혹은 하대정맥에서 혈액을 채혈하였다. 혈액을 냉장고에 2시간정도 방치한 후 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 채취한 혈청 내 AST(Aspartate Aminotransferase), ALT(Alanine Aminotransferase) 등의 수치를 측정하였다.

5. 체중측정 및 간의 중량 측정

실험기간동안 매일 오전 정해진 시간에 실험동물의 체중을 측정하였으며, 실험 마지막 날에는 부검 직전에 측정하였다. 부검을 통해 실험동물의 간을 분리 채취하여 중량을 측정하였다. 이후 간조직은 -50℃의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 -80℃에서 보관하였다.

6. 간조직의 해부조직학적 관찰

동결보관된 간조직의 일정부위를 연속적으로 8 ㎛ 두께로 냉동절편하여 H&E 염색법과 Oil Red O염색을 시행 후, 현미경 하에서 관찰하고 사진촬영 후 영상분석용 Axiovision LE software (Carl Zeiss Vision, ver 4.2 USA)를 이용하여 근육 단면의 면적(cross section area)을 측정하였다[18].

7. 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

면역조직화학염색은 자유부유법(free-floating)을 사용하였다. Primary antibody는 anti TNF-α(ab6671, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; ABcam)로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다.

면역반응의 결과를 정량화하기 위해 현미경 하에서 동일한 일정면적 내 핵 내에 명확하게 적갈색으로 염색된 세포 수를 세어 면역 양성반응으로 구분하고 세포수를 측정하여 수치화하였다.

8. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 SPSS 10.0를 이용하여 분석하였다. ANOVA 분석을 통해 유의성 여부를 확인 후,

Tukey's honestly significant difference를 사용하여 $P<0.05$ 및 $P<0.01$의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

측정된 모든 자료는 ANOVA 분석을 통해 유의성 여부를 확인 후, student's t-test를 사용하여 $P<0.05$ 및 $P<0.01$의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

Ⅲ. 결과

1. 사망률, 일반증상 및 체중변화

8주간의 실험기간 동안 모든 실험군에서 사망 개체수가 발생하지 않았으며 이상 증상은 관찰되지 않았다. 실험 마지막날 부검 후 육안으로 관찰한 결과 간조직 이외의 다른 조직에서의 이상 증상도 관찰되지 않았다.

각 실험군에서의 체중변화를 살펴보면, EtOH군과 EtOH+IS군에서 Normal군에 비해 전반적으로 체중이 감소된 경향이 나타났다. 8주간의 실험기간이 끝난 후 최종적인 체중은 Normal군에서 421.8±7.6 g, EtOH군이 366.3±2.5 g, EtOH+IS군에서 376.9±3.6 g으로 측정되어, EtOH군과 EtOH+IS군에서 Normal군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 1., $P<0.01$), EtOH군과 EtOH+IS군의 비교에서는 EtOH+IS군에서 EtOH군에 비해 상대적으로 약간의 최종적인 평균 체중의 회복이 있었으나, 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다.

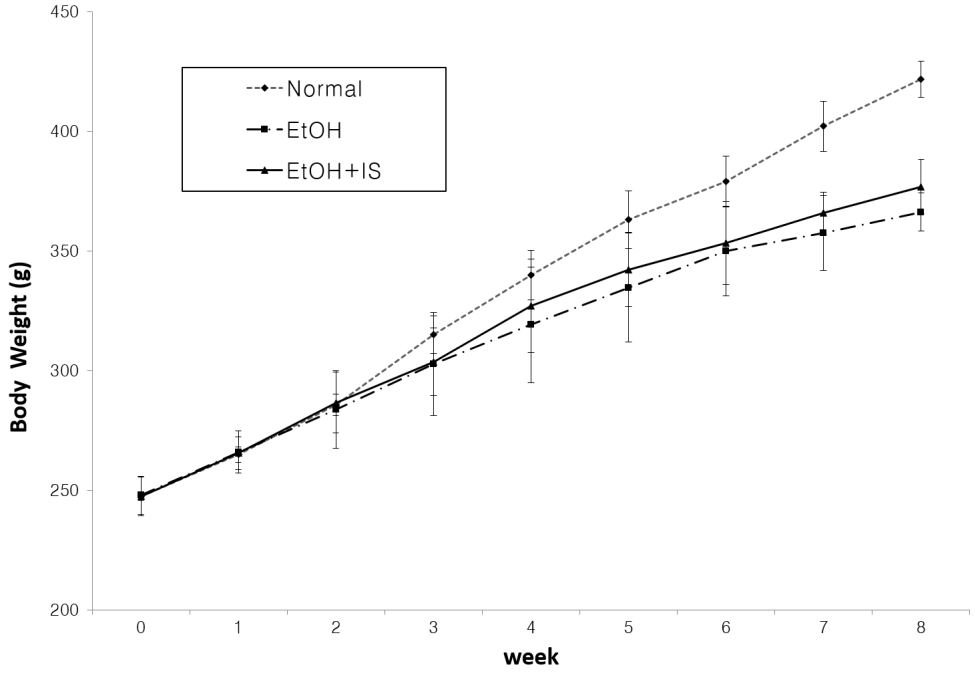

Fig. 1. The changes of mean body weights of rats during the 8 weeks.
Compared with Normal group, mean body weight of both EtOH and EtOH+IS groups was decreased for whole 8 weeks. There is no significant difference of the mean body weight between EtOH and EtOH+IS groups.
Data shown as mean±S.E.

2. 간의 중량 변화

실험 마지막날 흰쥐의 간을 적출하여 평균 무게를 측정한 결과 Normal군에서 17.3±0.3 g, EtOH이 15.7±0.3 g으로 측정되어 EtOH군에서 Normal군에 비해 유의한 감소가 관찰되었다(P<0.01). 반면, EtOH+IS군에서는 16.7±0.4 g으로 측정되어, 간무게의 감소가 완화되었으며 EtOH군에 비해 유의성 있는 증가가 확인되었다.

각 실험군에서의 최종적인 체중에 대한 간 중량의 비율로 환산하여 계산한 결과에서는 Normal군에서 4.1±0.1%, EtOH군이 4.3±0.1%, EtOH+IS군에서 4.4±0.1%으로 측정되어, EtOH+IS군과 EtOH군에서 모두 Normal군에 비해 간-체중비가 증가되었다. EtOH+IS군의 경우에는 EtOH군에 비해 증가량이 더 높았으나 통계적인 유의성은 없었다.

Table 2. Changes in Body Weight and Liver-Body Weight Ratio of Rats in Normal, EtOH and EtOH+IS Groups

Group	Normal	EtOH	EtOH+IS
Liver weight (g)	17.3±0.3	15.7±0.3$^{\#\#}$	16.7±0.4*
Liver-body weight ratio (%)	4.1±0.1	4.3±0.1	4.4±0.1

Data shown as mean±S.E. were analysed by the Student's t-test.
($^{\#\#}$: P<0.01 compared with Normal group., *: P<0.05 compared with EtOH group.)

3. 간손상의 지표

간손상에 대한 지표로써 실험 마지막날 실험동물로부터 채취한 혈액에서 혈청 ALT, AST의 수치를 비교분석한 결과, ALT의 경우 Normal군에서 27.6±2.5IU/L, EtOH군에서 53.4±2.1IU/L, 그리고 EtOH+IS군에서 44.5±2.0IU/L로 측정되어 EtOH군과 EtOH+IS군에서 모두 Normal군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었으며(P<0.01), EtOH군과 EtOH+IS군 간에도 EtOH+IS군이 EtOH군에 비해 유의성 있는 증가가 나타났다(P<0.05).

AST의 경우에서도 Normal군에서 115.6±3.7IU/L, EtOH군에서 194.6±6.1IU/L, 그리고 EtOH+IS군에서 178.1±8.7IU/L로 측정되어 EtOH군과 EtOH+IS군에서 Normal군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었으나(P<0.05), EtOH군과 EtOH+IS군 간에는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다.

Table 3. Blood Serum Chemistry Values of Rats in Normal, EtOH and EtOH+IS Groups

Group	Normal	EtOH	EtOH+IS
ALT (IU/L)	27.6±2.5	53.4±2.1$^{\#\#}$	44.5±2.0$^{\#\#*}$
AST (IU/L)	115.6±3.7	194.6±6.1$^{\#\#}$	178.1±8.7$^{\#\#}$

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.
Data shown as mean±S.E. were analysed by the Student's t-test.
($^{\#}$: P<0.05 compared with Normal group., $^{\#\#}$: P<0.01 compared with Normal group.,
*: P<0.05 compared with EtOH group.)

4. 간의 해부조직학적 변화

간조직의 일정부위를 8㎛ 두께로 냉동절편하여 H&E 염색법을 시행 후 현미경 하에서 관찰한 결과, 만성적인 알콜섭취로 인해 간조직의 변화를 확인할 수 있었는데 EtOH군에서 Normal군에 비해 지방방울(fat droplet)의 형성을 뚜렷이 관찰할 수 있었다. EtOH+IS군에서도 지방방울의 형성이 관찰되었으나 EtOH군에 비해 지방방울의 크기와 수가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Oil Red O염색을 시행한 결과에서도 EtOH군과 EtOH+IS군에서 Normal군이 비해 간조직으로의 지질침윤(lipid infiltration)이 관찰되었으나, EtOH+IS군에서 EtOH군에 비해 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

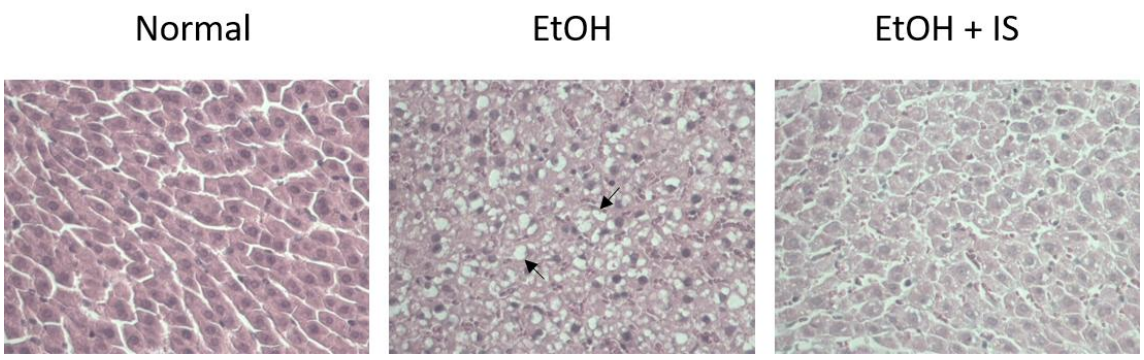

Fig. 2. Liver sections stained with hematoxylin and eosin(H&E) staining.
EtOH group showed significant histopathological alterations such as ballooning, fatty(arrows) and hydropic degeneration when compared with Normal group. Whereas, EtOH+IS group showed mild changes compared with EtOH group.
Images are at 200× magnification.

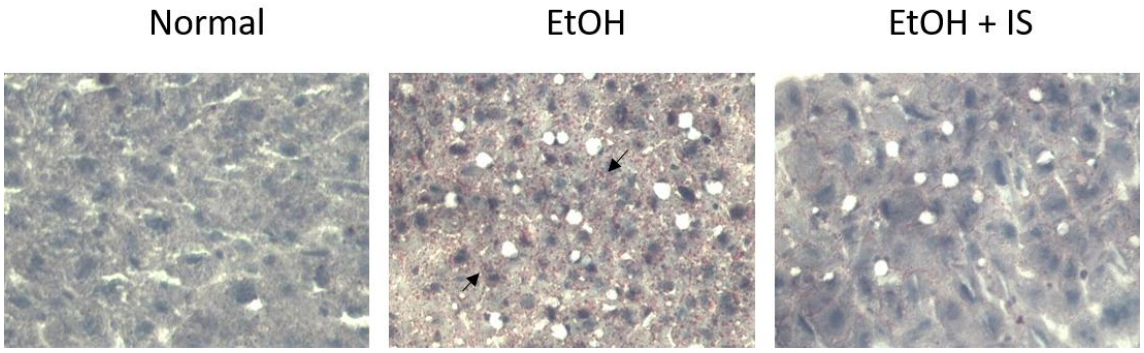

Fig. 3. Liver sections stained with Oil Red O staining.
EtOH group showed significant intrahepatic lipid infiltration, as indicated by an increased number of red hepatocytes(arrows) when compared with Normal group. Whereas, EtOH+IS group demonstrated significantly decreased lipid infiltration compared with EtOH group.
Images are at 400× magnification.

5. 간조직에서의 TNF-α의 발현 변화

면역조직화학 염색법을 통하여 각 실험군의 간조직에서의 TNF-α 단백질의 발현을 관찰하였다. 그 결과, EtOH군에서 Normal군에 비해 면역반응이 뚜렷이 증가되는 것으로 관찰되었으며, EtOH+IS군에서도 Normal군에 비해 면역반응이 증가되었으나, EtOH군에 비해서는 완화되는 것으로 관찰되었다(Fig. 4.).

육안으로 확인한 면역반응을 수치화하기 위하여 현미경 하의 일정면적에서 양성반응을 보인 세포수를 측정하였다. 그 결과, Normal군은 8.9±3.1개/1.2×10^5 ㎛^{2}인 반면, EtOH군에서는 43.5±5.0개/1.2×10^5 ㎛^{2}로 EtOH+IS군에서는 30.5±2.5개/1.2×10^5 ㎛^{2}로 관찰되어 EtOH군과 EtOH+IS군에서 모두 Normal군에 비해 유의성 있는 증가가 확인되었다($P<0.01$). 한편, EtOH군과 EtOH+IS군의 비교에서는 EtOH+IS군에서 EtOH군에 비해 면역 양성반응 세포수가 유의성 있게 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 4., $P<0.05$).

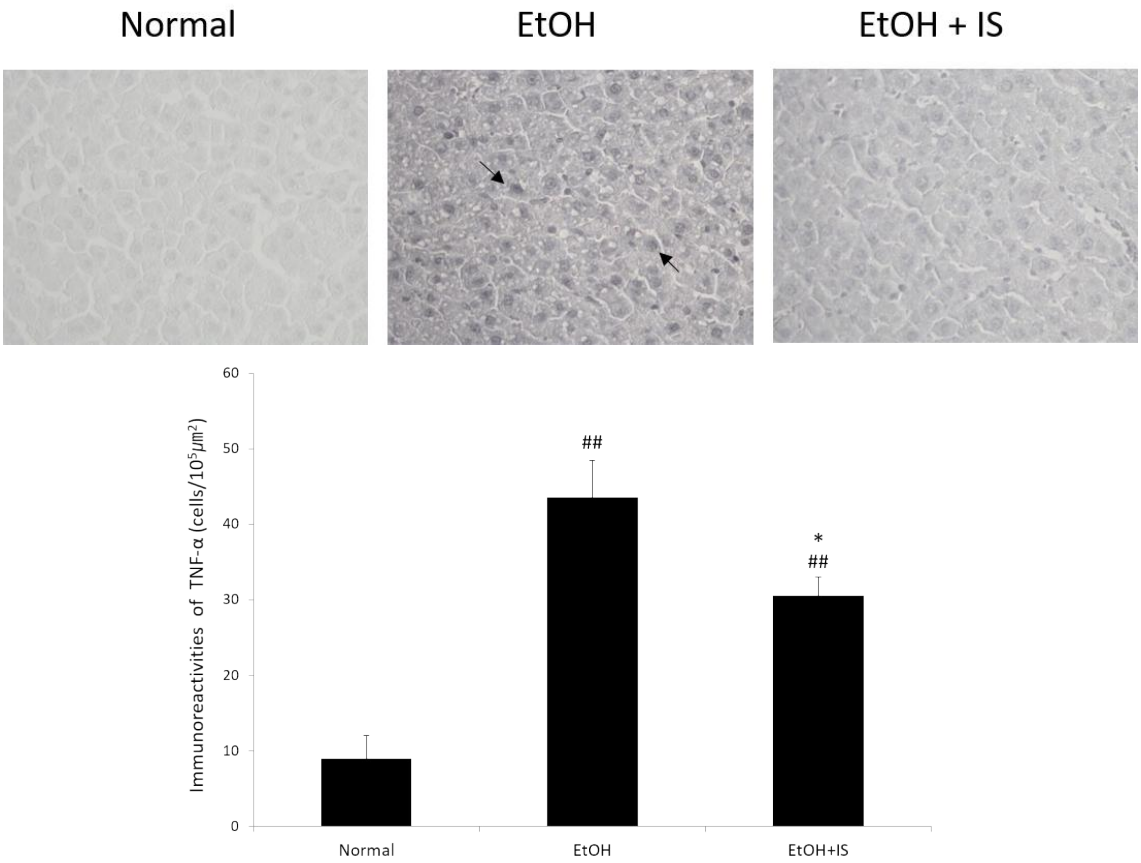

Fig. 4. Immunohistochemical staining of TNF-α proteins.
The increased level of TNF-α immunoreactivity was observed in the EtOH group(arrows). Whereas, the expressions of TNF-α protein in EtOH+IS group were decreased to compared with EtOH group. Images are at 200× magnification.
(##: P<0.01 compared with Normal group., *: P<0.05 compared with EtOH group.)

Ⅳ. 고찰

장기간의 알콜섭취는 신체에 다양한 영향을 미치게 되는데, 이전의 실험적 연구를 통하여 흰쥐에 오랜 기간 에탄올을 경구 투여한 경우 체중이 감소되는 것으로 알려졌다[13,14]. 본 연구에서도 흰쥐에 8주간의 알콜을 투여한 결과 전반적으로 체중이 감소되는 경향이 나타났다. 즉, 에탄올을 경구 투여한 EtOH군과 EtOH+IS군에서 같은 양의 생리식염수를 투여한 Normal군에 비해 흰쥐의 체중이 감소되었는데, 실험 마지막날의 최종 체중의 비교에서도 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 1., P<0.01). 에탄올 투여 후 인진사령산 물추출물을 투여한 EtOH+IS군과 EtOH군 간에는 EtOH+IS군이 EtOH군에 비해 체중감소가 약간 회복되었으나, 유의성 있는 차이는 발견되지 않았다. 이러한 결과는 만성적인 알콜섭취 후 체중이 감소된다는 이전 연구결과[13,14]와 일치하는 것이며, 또한 인진사령산 투여는 알콜섭취로 인한 체중 감소에 유의한 영향을 미치지는 않은 것으로 확인되었다.

알코올성 간지방 발생과정에서 지방 축적에 따른 간 실질세포의 감소로 간 중량의 감소가 뚜렷하게 유발되는 것으로 알려있는데[15,16], 본 연구에서 8주간의 알콜섭취 후 흰쥐의 간을 적출하여 무게를 측정한 결과에서도 EtOH군과 EtOH+IS군에서 모두 Normal군에 비해 간의 평균 중량이 감소하였으며, 특히 EtOH

군에서는 Normal군에 비해 유의한 감소를 확인할 수 있었다(Table 2., P<0.01). EtOH+IS군에서도 Normal군에 비해 간의 평균 중량이 감소되었으나 EtOH군에 비해 감소량이 회복되었으며 통계적으로도 EtOH군에 비해 간 중량의 유의한 증가를 확인할 수 있었다(Table 2.). 각 실험군의 흰쥐 체중에 대한 간의 무게를 환산하여 비교한 결과에서는 EtOH+IS군과 EtOH군에서 Normal군에 비해 간-체중 비가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. EtOH+IS군과 EtOH군의 비교에서는 EtOH+IS군이 EtOH군에 비해 간-체중 비의 증가가 더욱 촉진된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 비록 통계적 유의성을 보이지는 않았으나, 인진사령산 투여는 알콜섭취로 인한 간의 중량 감소와 간-체중 비의 증가를 촉진시키는 경향이 있는 것으로 사료된다.

여러 가지 원인들에 의해 간손상이 유발될 경우, 체내의 다양한 효소들의 변화를 통해 간손상의 정도를 측정할 수 있다. 손상된 간세포로부터 혈액으로 유리되어 나오는 효소들 중에 ALT와 AST 효소는 간손상의 진단에 있어 매우 민감한 지표로 활용되는데[17,18], 본 실험에서 8주간의 알콜투여 후 ALT와 AST의 상승이 나타났다. 에탄올을 투여한 EtOH군과 EtOH+IS군에서 Normal군에 비해 ALT와 AST 모두 유의성 있는 증가가 나타났다(Table 3., P<0.01). 이러한 결과는 8주간의 알콜투여로 인해 간기능이 손상되었음을 보여주는 것이다. 인진사령산 물추출물을 경구 투여한 EtOH+IS군에서는 EtOH군에 비해 ALT와 AST 수치의 상승이 완화된 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 ALT의 경우에서는 유의성 있는 감소가 나타났다(Table 3., P<0.05). 이러한 결과는 인진사령산이 만성적인 알콜투여로 인한 ALT와 AST의 증가를 억제시키는 효능이 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

알콜섭취로 인한 간의 해부조직학적 변화를 관찰하기 위해, 8주간의 알콜 경구투여 후 간조직을 H&E염색을 통해 관찰한 결과, EtOH군에서 Normal군에 비해 염증세포 침윤과 지방변성, 수포변성(hydropic degeneration) 등에 따른 지방방울(fat droplet)의 형성이 뚜렷하게 관찰되었다. EtOH+IS군에서도 이러한 조직학적 병변이 관찰되었으나 EtOH군에 비해 현저히 감소된 것이 관찰되었다. 간조직에 대한 Oil Red O염색을 시행한 결과에서도 EtOH군과 EtOH+IS군에서 Normal군이 비해 간조직으로의 지질침윤이 뚜렷이 관찰되었으나, EtOH+IS군에서 EtOH군에 비해 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 인진사령산 투여는 만성적인 알콜섭취로 인한 간세포의 퇴행적 변화, 특히 지방방울의 형성을 억제하여 지방간 형성을 감소시키고 간조직을 보호하는 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

알콜성 지방간 발생의 기전에는 많은 단백질들이 관여하게 되는데, 그 중에 Tumor necrosis factor-α (TNF-α)는 여러 간질환에서 간독성의 매개로써의 역할을 수행하며 간손상의 경우 증가하게 되고 이후의 지방간이나 간경화(liver fibrosis) 등의 질환 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[19]. 알콜섭취로 인한 간손상에 있어 가벼운 음주에서는 단핵구(monocyte)들에 의해 TNF-α의 생성이 억제되는 것으로 알려져 있다[20]. 하지만, 만성적인 알콜 섭취는 장 투과성(gut permeability)을 증가시키고 장에서 유래된 지질다당류(lipopolysaccharide)를 통하여 내독소혈증(endotoxemia)을 유발시키게 된다. 이는 TNF-α가 매개된 염증성 cytokine들을 생성하는 NF-kB를 활성화시키게 된다[21]. 이와 관련된 실험적 연구를 통해서도 알콜로 유발된 간손상에서의 TNF-α의 필수적인 역할이 확인되었는데, TNF receptor 1 deficient mice에 알콜을 투여해도 간손상이 유발되지 않았으며[22], 알콜성 간손상에서 질환의 정도 및 사망률과 TNF-α의 수치 사이에 연관성이 있음이 밝혀졌다[23]. 또한 지방간질환에 대한 역학연구에서도 알콜섭취량과 혈청 TNF-α 농도 간에 상관관계가 있음이 밝혀졌다[24]. 이처럼 TNF-α는 지방간을 비롯한 간손상에 중요한 매개체로서의 역할을 하며 알콜로 인한 지방간 형성에도 이러한 TNF-α가 핵심적인 역할을 수행하게 된다. 따라서 알콜섭취로 인한 지방간을 억제하기 위해서는 TNF-α의 조절이 관건이 될 수 있다[25].

본 연구에서 인진사령산의 간세포에서 지방합성 억제효과에 대한 TNF-α의 역할을 검증하기 위하여 면역조직화학 염색법을 통해 각 실험군 간조직에서의 TNF-α 단백질의 발현을 관찰하였다. 그 결과, Normal군에서는 TNF-α의 발현이 거의 관찰되지 않은 반면, 8주간 알콜을 투여한 EtOH군과 EtOH+IS군에서는 Normal군에 비해 면역반응이 뚜렷이 증가되었으며, 특히 EtOH군에서 Normal군에 비해 면역반응이 뚜렷이 증가된 반면, EtOH+IS군에서는 EtOH군에

비해서 발현이 감소되는 것으로 관찰되었다(Fig. 4.). 이러한 결과는 8주간의 알콜섭취로 인해 간조직에서의 TNF-α의 발현이 증가되었음을 보여주는 것이며, 인진사령산 투여로 인해 이러한 TNF-α의 발현이 감소되었음을 나타내는 것이라 할 수 있다. 면역반응을 객관적으로 수치화하기 위하여 현미경 하의 일정 면적에서 TNF-α에 대해 양성반응을 보인 세포수를 측정한 결과에서도, Normal군에 비해 EtOH군과 EtOH+IS군에서 모두 발현이 유의성 있는 증가되는 것으로 확인되었다(Fig. 4., $P<0.01$). 하지만, EtOH+IS군에서 EtOH군에 비해 면역 양성반응 세포수가 유의성 있게 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 4., $P<0.05$). 이러한 결과는 만성적인 알콜섭취로 인해 간조직에서의 TNF-α의 발현이 유의성 있게 증가하였으며, 인진사령산의 투여는 이러한 TNF-α의 증가를 유의성 있게 억제시켰음을 보여주는 것으로 인진사령산이 알콜성 지방간에서의 TNF-α의 조절에 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다.

위의 결과들을 종합하면, 인진사령탕은 흰쥐에서 8주간의 만성적인 알콜 투여로 인한 체중감소에는 유의한 영향을 미치지 않았으나, 알콜투여로 인한 간의 무게감소와 간-체중비 증가를 촉진시켰다. 혈액생화학적 검사에서는 장기간의 알콜섭취로 인한 ALT와 AST의 상승을 유의하게 감소시켰으며 간세포의 해부조직학적 변화에 있어서도 지방방울의 형성, 지방변성과 같은 병리적 변화를 감소시켰다. 이러한 효과는 알콜섭취로 인한 간세포에서의 TNF-α의 증가를 억제시키기 때문인 것으로 사료된다. 다만, 본 연구에서는 알콜성 지방간의 형성 기전 중에서 TNF-α의 변화만을 관찰하였으나, 추후 후속 연구를 통해 지방간 형성에 관여하는 다른 다양한 인자 및 기전에 대한 연구가 이어져야 할 것이다. 또한, 알콜성 지방간 외에 비알콜성 지방간에 대한 인진사령산의 효과에 대한 검증도 이루어져야 하리라 사료된다.

V. 결론

만성적인 알콜투여로 유발된 지방간 손상에 대한 인진사령탕의 보호효과를 검증하기 위하여 흰쥐에 25% EtOH을 8주간 경구투여하여 장기적인 간손상을 통하여 지방간 형성을 유발하고 인진사령산 물추출물을 투여한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

인진사령산은 만성적인 알콜섭취로 인한 체중감소에는 유의한 영향을 미치지 않았고, 알콜투여로 인한 간의 무게 감소를 유의하게 억제하고, 간-체중비 증가를 촉진시켰다. 또한 8주간의 장기적인 알콜섭취로 인한 ALT와 AST의 상승을 유의하게 억제시켰다. 간세포의 해부조직학적 변화에 있어서도 알콜섭취로 인한 지방방울의 형성, 지방변성과 같은 병리적 변화를 감소시켰다. 이러한 알콜성 지방간에 대한 보호효과는 간세포에서의 TNF-α의 발현을 효과적으로 억제시키기 때문인 것으로 사료된다.

이와 같은 결과로 인진사령산은 만성적인 알콜섭취로 인한 지방간에 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

References

1. Baraona E, Lieber CS. Effects of ethanol on lipid metabolism. J Lipid Res. 1979;20(3):289-315.
2. 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.
3. Chacko KR, Reinus J. Spectrum of Alcoholic Liver Disease. Clin Liver Dis. 2016;20(3):419-27
4. An L, Wang X, Cederbaum AI. Cytokines in alcoholic liver disease. Arch Toxicol. 2012;86(9):1337-48.
5. Yang W, Huang L, Gao J, Wen S, Tai Y, Chen M, Huang Z, Liu R, Tang C, Li J. Betaine attenuates chronic alcohol-induced fatty liver by broadly regulating hepatic lipid metabolism. Mol Med Rep. 2017;16(4):5225-34.
6. Abdelmegeed MA, Banerjee A, Jang S, Yoo SH, Yun JW, Gonzalez FJ, Keshavarzian A, Song BJ. CYP2E1 potentiates binge alcohol-induced gut leakiness, steatohepatitis, and apoptosis. Free Radic Biol Med. 2013;65:1238-45.
7. Pyo IJ, Lee JH, Woo HJ, Kim BW. Effects of Injinsaryung-san on Experimental Liver Damage

in Rats. J Korean Oriental Med. 1995;16(2): 281-98.
8. Ko H, Lee JH, Woo HJ. The Effects of 5 kinds of Injinsaryung-San fractions on Cell Viability, Cell Cycle Progression and Fas-mediated Apoptosis of HepG2 Cells. J Korean Oriental Med. 2000;21(3):174-85.
9. Jang KS, Baik TH, Ha JY. Effects of Bojungikkitanghapinjinsaryungsan on rat liver injured by CCl_4. Korean J. Oriental Medical Pathology. 1997;11(1):12-20.
10. Yun KS, Woo HJ, Lee JH, Kim YC. Effect of Injinchunggan-tang & Injinsaryung-san on NASH induced by MCD-diet in A/J mice. Korean J. Orient. Int. Med. 2009;30(2): 410-21.
11. Lee JH, Park SM, Kim YC, Woo HJ. Clinical Study of the Effects of Chungganhaeju-tang on Alcoholic Fatty Liver. J Korean Oriental Med. 2001;22(4):107-13.
12. Kim JJ, Seo BI, Choi HS, Kim SM, Woo CH, Koo JS, Park GY. Preventive Effects of Daekumeumja on Fatty Degeneration of Liver and Immunosuppression Induced by Alcohol. Korean J Oriental Medicine. 2010;16(2):167-79.
13. Macieira MS, Almeida WG, Silva EA, Schenberg LC, Nakamura-Palacios EM. Alcohol dependenceinduced in rats by semivoluntary intermittent intake. Braz J Med Biol Res. 1997;30(9):1107-11.
14. Larue-Achagiotis C, Poussard AM, Louis-Sylvestre J. Alcohol drinking, food and fluidintakes and body weight gain in rats. Physiol Behav. 1990;47(3):545-8.
15. Adeneye AA. Benebo AS. Oral metformin-ascorbic acid co-administration ameliorates alcohol-induced hepatotoxicity in rats. Nig Q J Hosp Med. 2007;17:155-9.
16. Faremi TY. Suru SM. Fafunso MA. Obioha UE. Hepatoprotective potentials of Phyllanthusamarus against ethanol-induced oxidative stress in rats. Food Chem Toxicol. 2008;46:2658-64.
17. Herlong HF. Approach to the patient with abnormal liver enzymes. Hosp Pract. 1994; 29(11):32-8.
18. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. EXCLI J. 2016;15:817-28.
19. Willner IR, Reuben A. Alcohol and the liver. Curr Opin Gastroenterol. 2005;21(3):323-30.
20. Poullis A, Mendall MA. Alcohol, obesity, and TNF-alpha. Gut. 2001;49(2):313-4.
21. Altamirano-Barrera A, Uribe M, Chávez-Tapia NC, Nuño-Lámbarri N. The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. J Nutr Biochem. 2018;60:1-8.
22. Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. Gastroenterology. 1999;117(4):942-52.
23. Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF, Veech GA, Veech RL. Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis. Alcohol Clin Exp Res. 1990;14(2):255-9.
24. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. Alcohol. 2004;34(1):9-19.
25. French JB, Bonacini M, Ghabril M, Foureau D, Bonkovsky HL. Hepatotoxicity Associated with the Use of Anti-TNF-α Agents. Drug Saf. 2016;39(3):199-208.