

곤드레 (*Cirsium setidens*) 에탄올 추출물의 알코올성 지방간 손상 억제 효과*

김은혜 · 정자용†

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

Protective effects of *Cirsium setidens* ethanolic extracts against alcoholic fatty liver injury in rats*

Kim, Eun-Hye · Chung, Jayong†

Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

ABSTRACT

Purpose: In this study, we investigated the effects of *Cirsium setidens* ethanolic extract (CS) on the development of alcoholic fatty liver and associated injury. **Methods:** Sprague-Dawley male rats were fed either Lieber-DeCarli control (C) or ethanol (35.5% of total calories) liquid diet with 0 (E), 100 mg/kgBW CS (E+LCS), or 500 mg/kgBW CS (E+HCS) for 8 weeks. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities as well as TG and cholesterol concentrations in the serum and liver tissues were measured by colorimetric assays. Liver histopathology was examined by Hematoxylin-eosin staining of the fixed liver tissues. Protein levels of phosphorylated-AMP activated protein kinase (p-AMPK), phosphorylated-acetyl CoA carboxylase (p-ACC), phosphorylated-nuclear factor kappa B (p-NFκB), and TNFα were measured by Western blot analyses. **Results:** Both doses of CS markedly suppressed alcohol-induced lipid droplets accumulation in the liver tissues and significantly inhibited alcohol-induced increases in activities of serum ALT and serum AST. Similarly, CS significantly reduced hepatic and serum TG concentrations. Compared to groups fed alcohol only, CS supplementation strongly increased hepatic levels of p-AMPK and p-ACC. Further, CS significantly inhibited alcohol-induced phosphorylation of NFκB, which was associated with reduced hepatic protein levels of TNFα. **Conclusion:** Our data demonstrated that CS has a protective effect against alcoholic liver injury, which was associated with activation of AMPK and inhibition of NFκB.

KEY WORDS: alcoholic liver disease, *Cirsium setidens*, AMP-activated protein kinase, nuclear factor kappa B

서 론

알코올은 가장 흔하게 남용되는 음료 중의 하나로 우리나라 19세 이상 성인의 월간 음주율은 평균 60.1%으로 매우 높으며,¹ 음주로 인한 사회경제적 비용은 연간 9조 4,524억원에 달하는 것으로 보고되고 있다.² 알코올성 지방간은 간 세포에 중성지방이 비정상적으로 축적되는 상태로 습관적인 음주자의 대부분에서 나타난다. 알코올성 지방간은 알코올성 간질환의 가장 초기 단계로 수 주 이상 금주하는 경우 정상적으로 회복될 수 있으나, 간염, 간섬유증, 간경변증 등의 좀 더 심각한 형태의 간 손상으로의 진

행을 가속화 할 수 있으므로,³⁻⁵ 초기에 예방하는 것이 필요하다.

곤드레 (*Cirsium setidens*)는 국화과의 다년생 초본으로 주로 해발 700 m 이상의 고지에서 자생하며, 맛이 담백하고 부드러워 나물 등의 요리에 흔히 사용되는 식재료이다. 또한, 고려영경귀라고도 불리며 한방에서 염증, 부종, 고혈압 등의 여러 증상에 사용되어 왔다.⁶ 곤드레의 잎 부분에는 탄수화물의 함량이 높고 리놀렌산, 리놀레산 등의 필수 지방산이 함유되어 있으며, 칼륨 등 총 7가지 무기성분이 함유되어 있는 등 다양한 영양성분을 함유하고 있다.⁷ 뿐만 아니라, pectolinarin을 비롯하여 luteolin, hispidulin,

Received: October 18, 2016 / Revised: November 11, 2016 / Accepted: November 30, 2016

*This work was supported by grants from the Basic Science Research Program of the Korean National Research Foundation (2013R1A1A2007613).

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-961-0977, e-mail: jchung@khu.ac.kr

© 2016 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

apigenin 등 여러 종류의 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며,^{8,9} 이에 따라 곤드레의 생리 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁰⁻¹² 특히, CCl₄로 유도된 간 손상 모델에서 곤드레 추출물 (500 mg/kgBW)의 투여시 간 손상이 유의적으로 억제되었으며,¹³ 이와 비슷하게 D-galactosamine으로 유도된 간 손상 모델에서 곤드레 추출물 혹은 곤드레에서 추출한 pectolinarin의 투여 농도에 비례하여 간 손상 지표인 혈청 AST와 ALT 농도가 유의적으로 감소함이 보고된 바 있다.¹⁴ 이는 곤드레 추출물이 간 손상 억제에 효과적임을 제시하나, 알코올성 간 손상 혹은 알코올성 지방간에 있어 곤드레 추출물의 보호 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다.

AMPK (AMP-activated protein kinase)는 세포 내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소로 각종 에너지 대사 조절에 밀접하게 관여하여 소위 대사 조절의 만능스위치 (master switch)라고도 불린다.^{15,16} 특히 AMPK는 지방산의 합성과 분해를 매개함으로써 간 지방 대사의 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라, *in vitro* 연구를 통해 간 세포에 에탄올을 처리했을 때 AMPK 활성이 억제되고,¹⁷ 알코올에 만성적으로 노출된 쥐의 간 조직의 경우 정상 대조군에 비해 AMPK 활성이 유의적으로 감소됨이 보고된 바 있어,¹⁸ 알코올성 지방간 발생에 있어 AMPK의 역할이 주요하게 작용할 수 있음을 제시한다. 이에 본 연구에서는 만성적인 알코올 섭취 시 곤드레 에탄올 추출물이 간 조직의 AMPK 활성 및 알코올성 지방간과 간 손상에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

연구방법

실험동물 및 식이구성

4주령 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley rat; Nara Biotech., Seoul, Korea) 28마리를 온도 20 ± 2°C, 습도 50 ± 10%, 12 시간/12시간 명암 주기의 조건 아래 일주일 간 일반 사료로 적응시킨 후, 액상 사료인 Lieber-DeCarli diet (DYET# 710260, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)를 공급하였다. 실험 동물은 군당 7마리씩 총 네 군 [정상 대조군 (C), 알코올 군 (E), 알코올 + 100 mg/kgBW 곤드레 에탄올 추출물 군 (E+LCS), 알코올 + 500 mg/kgBW 곤드레 에탄올 추출물 군 (E+HCS)]로 나누었다. 알코올 식이는 알코올이 전체 열량의 35.5%를 차지했으며, 정상 식이에는 알코올을 대체하여 말토오스 덱스트린 89.6 g을 추가하여 두 식이의 리터 당 열량 함량이 동일하도록 하였다. 이 때 알코올을 포함하는 세 군은 2주에 걸쳐 식이 알코올 (99% 에탄올, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 함유량을 2% (v/

v)부터 시작하여 최종 농도인 6.4% (v/v)까지 점차적으로 양을 늘려 적응시켰다. 이후 곤드레 알코올 추출물을 알코올 식이에 직접 섞어 매일 신선한 상태로 8주간 공급하였다. 곤드레 에탄올 추출물은 동결 건조한 곤드레를 70% 에탄올로 추출하였으며 (수율 18.3%), 공급 전까지 -80°C에 보관하였다. 본 연구에 사용한 곤드레 에탄올 추출물은 HPLC 분석 결과, pectolinarin과 pectolinarigenin을 각각 46.2 ± 0.8 mg/g과 1.5 ± 0.03 mg/g을 함유하고 있었다. 그룹간 식이와 알코올 섭취 수준을 동일하게 맞추기 위하여, 전날 가장 적게 섭취한 그룹의 평균 섭취량을 기준으로 하여 pair-feeding 하였다. 본 연구는 경희대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다 (KHR-2012-01-7).

간 조직의 병리학적 검사

적출한 간 조직을 10% formalin에 48시간 고정 후 파란 블록을 제작하였고 5 µm 두께의 절편을 만들어 슬라이드를 제작하였다. Hematoxylin-eosin 용액으로 염색을 실시한 후, 광학현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 지방구 정도는 100배율 상태에서 관찰 면적당 지방구를 포함하고 있는 간 세포의 비율을 4점 척도 (1점 = 6% 미만, 2점 = 6~33%, 3점 = 33~66%, 4점 = 66% 이상)로 측정하였다. 객관적인 평가를 위해 처리군을 알지 못하는 두 명 이상의 연구원이 슬라이드를 관찰하여 판정하였다.

간 조직과 혈청의 중성지방과 총 콜레스테롤 농도 및 혈청의 ALT와 AST 농도 측정

중성 지방과 총 콜레스테롤 정량을 위해 우선 간 조직의 지질 성분을 추출하였다. 간 조직 100 mg을 PBS-10 mM EDTA (pH 7.4) 용액 1 mL에 넣고 균질화하였다. 여기에 2 mL isopropanol-hexane-water (80:20:2 v/v/v), 0.5 mL hexane-diethyl ether (1:1), 1 mL 3차 증류수 순으로 용매를 넣고 잘 흔들어 지질 성분을 추출하였다. 30분 이상 상온에 방치하여 최종 상층액을 취하였으며, 질소가스로 유기용매를 휘발 시킨 후, isopropanol 20 µL으로 재용해하였다. 이후, 간 조직의 지질 추출 용액과 혈청의 중성 지방 농도와 총 콜레스테롤 농도는 상업용 시약을 이용하여 비색 정량 하였다 (BCS 중성지방 측정용 키트와 BCS 총 콜레스테롤 측정용 키트; JW Medical, Seoul, Korea).

혈청의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 효소 활성을 상업용 측정 키트 (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

Western blot 분석

간 조직을 RIPA buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1%

NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitor tablet (Roche, Indianapolis, IN, USA)]에 넣고 균질화 후, 15분간 14,000 rpm에서 상층액을 분리하였다. 이렇게 얻어진 시료의 단백질 농도는 Bradford assay를 (Coomassie blue protein assay reagent, Waltham, MA, USA)이용하여 정량 하였다. 50 µg 간 조직 균질 용액을 2× loading buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 끓여준 후 10% SDS-PAGE 로 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF 지 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)로 옮긴 후, Ponceau S 용액 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 염색으로 확인하였다. 이 후, TBS-T 용액에 희석한 5% 탈지분유 (Difco, Sparks, MD, USA) 용액에 2시간 이상 처리하였다. 1차 항체는 phosphorylated- acetyl-CoA carboxylase (p-ACC), ACC, phosphorylated-AMPK (p-AMPK), AMPK, phosphorylated- nuclear factor kappa B (p-NFκB), NFκB (이상 Cell signaling, CA, USA), TNFα (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 1:500~1,000의 비율로 희석하여 사용하였다. TBS-T 용액로 충분히 세척한 후 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG (H+L)-horse radish peroxidase conjugate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 1:5,000의 비율로 희석하여 반응시켰다. ECL 용액 (Clarity western ECL substrate, BioRAD)으로 반응시킨 뒤, chemiluminescence image system (Clix Science Instruments Inc., Shanghai, China)을 이용하여 밴드의 진하기를 정량 하였다. 인산화된 단백질의 발현 수준은 해당 단백질의 전체 단백질 발현 수준을 기준으로 상대적인 값으로 계산하였다.

Real-time RT-PCR

TRIzol 용액 (Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 사용하여 간 조직의 total RNA를 추출하고, 아가로스 겔 전기영동으로 RNA 상태를 확인하였다. 또한, 260 nm와 280 nm에서 흡광도 (Nano 2000 Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 측정하여 RNA의 농도와 순도를 확인하였다. Total RNA 100 ng으로부터 Prime Script™ RT 용액 키트 (Takara Bio, shiga, Japan)를 이용해 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio)를 사용하여 MJ mini™ thermal cycler (Bio-Rad)에서 수행하였으며, 반응조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 총 40회 수행하였다. GAPDH를 대조 유전자로 하여 지질 합성 관련 유전자인 SREBP1 (sterol regulatory binding protein 1), FAS (fatty acid synthase), SCD1 (stearyl coA desaturase 1)의 상대적인 발현 정도를

계산하였다. 사용한 primer sequence는 SREBP1: GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT, AGG AAG GCT TCC AGA GAG GA, FAS: TGT TCT CAA GGA AGG CAC TG, GAG TCC ACC CAC TGG AAA CT, SCD-1: ATG CCG GCC CAC ATG CTC CAA G, CGC ACA AGC AGC CAA CCC ACG T; GAPDH: TCC TGC ACC ACC ACC TGC TTA G, TTC TGA GTG GCA GTG AT GGC A이다.

통계분석

모든 값은 평균과 표준오차로 표시하였고, 각 군 간 평균값의 차이는 One-way analysis of variance (ANOVA)로 분석 후 Duncan's multiple range test로 사후검정을 실시하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였으며, 모든 통계분석은 Statistical Analysis Systems (SAS) ver.9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA)을 사용하였다.

결 과

실험 시작 시, 네 군 간의 체중의 차이는 없었다.식이 중 알코올 함량이 증가하면서 알코올군들 (E, E+LCS, E+HCS)에서 초기 체중 증가가 잠시 정체되었으나 이후 체중 증가가 회복되기 시작하였으며, 실험 종료 시 네 군 간 평균 체중에는 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 1).

간 조직의 지방간 발생 정도를 현미경으로 관찰한 결과, 알코올을 공급한 E군에서는 다수의 지방구가 나타났으며, 정상 대조군인 C군은 이와 대조적으로 지방구를 거의 관찰할 수 없었다. 한편, 알코올 식이와 함께 곤드레 에탄올 추출물을 투여한 E+LCS 군과 E+HCS군의 경우, 지방구

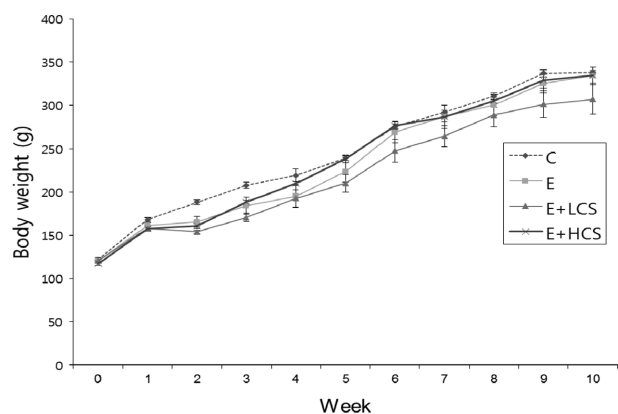


Fig. 1. Effects of *Cirsium setidens* ethanol extract (CS) on body weight changes in ethanol-fed rats. C: control diet, E: ethanol diet, E+LCS: ethanol diet with 100 mg/kg BW CS, and E+HCS: ethanol diet with 500 mg/kg BW CS

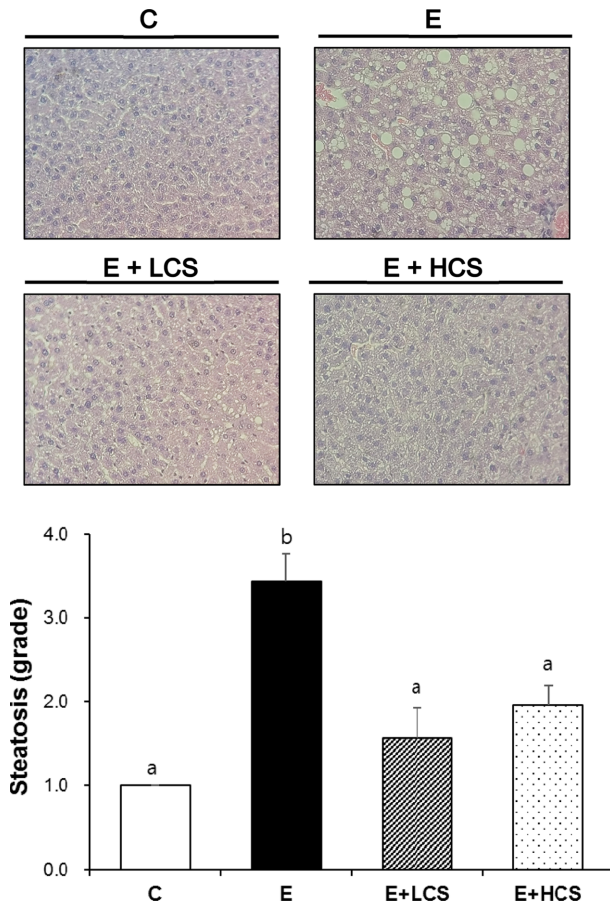


Fig. 2. Effects of *Cirsium setidens* ethanol extract (CS) on the development of hepatic steatosis in ethanol-fed rats. C: control diet, E: ethanol diet, E+LCS: ethanol diet with 100 mg/kg BW CS, and E+HCS: ethanol diet with 500 mg/kg BW CS (upper) Representative hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of liver tissue are shown at 200x. (lower) The degree of hepatic steatosis was graded 1 to 4 based on the average percent of fat-accumulated hepatocytes per field at 100X magnification (grading 1 = < 6%, 2 = 6~33%, 3 = 33~66%, 4 = > 66%). Data are the means \pm SE (n = 7). Different letter indicate significant difference (p < 0.05).

형성 정도가 크게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 간 손상 지표인 혈청 ALT와 AST의 활성도를 측정한 결과, 두 가지 효소의 활성 모두 E군에서 C군에 비해 유의적으로 높았으며, E+LCS군과 E+HCS군의 경우 E군에 비해 유의적으로 낮았고 C군과는 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 3).

간 조직의 중성 지질 농도와 콜레스테롤 농도는 E군에서 C군에 비해 유의적으로 높았으며, 혈청의 중성지질 농도와 콜레스테롤 농도 또한 E군이 C군에 비해 유의적으로 높았다 (Fig. 4). 곤드레 에탄올 추출물을 제공한 경우, 두 군 (E+LCS, E+HCS) 모두 간 조직과 혈청의 중성지질 농도를 E군에 비해 유의적으로 낮추었다. 한편 곤드레 에탄올 추출물 섭취는 간과 혈청의 콜레스테롤 농도에는 유의적인 변화를 주지 않았다.

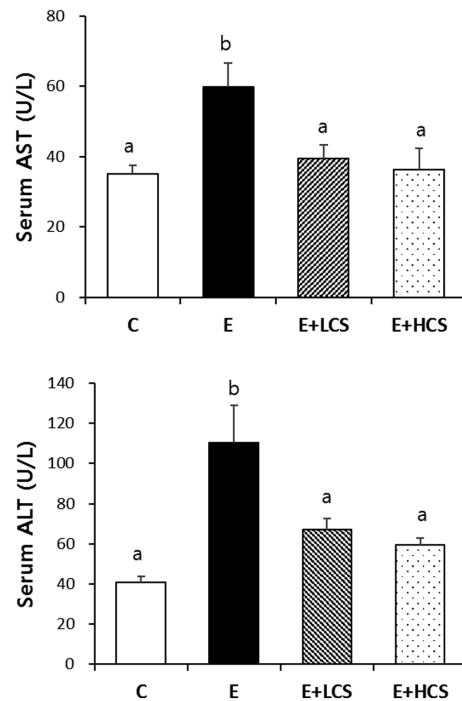


Fig. 3. Effects of *Cirsium setidens* ethanol extract (CS) on serum ALT and serum AST activities in ethanol-fed rats. C: control diet, E: ethanol diet, E+LCS: ethanol diet with 100 mg/kg BW CS, and E+HCS: ethanol diet with 500 mg/kg BW CS. Data are the means \pm SE (n = 7). Different letter indicate significant difference (p < 0.05).

알코올 식이와 곤드레 에탄올 추출물의 투여가 AMPK의 활성 및 관련 signaling에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 간 조직의 phosphorylated-AMPK와 phosphorylated-ACC의 수준을 western blot analysis로 측정하였다. 그 결과, E+HCS군은 E군에 비해 p-AMPK의 수준이 유의적으로 높았고, E+LCS군과 E+HCS군 모두 E군에 비해 p-ACC 수준이 높게 나타났다 (Fig. 5).

AMPK 활성화에 의해 조절되는 지질 합성 관련 유전자 발현 수준을 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. E군은 C군에 비해 FAS mRNA 수준이 유의적으로 증가하였으며, SREBP1 mRNA와 SCD1 mRNA 수준도 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다 (Fig. 6). 또한, E+HCS군은 E군에 비해 FAS mRNA와 SCD1 mRNA 수준이 유의적으로 낮게 나타났다.

한편, 염증시 증가되는 TNF α 수준을 측정한 결과, E군에서 C군에 비해 2배 이상 유의적으로 증가하였다 (Fig. 7). 식이 곤드레 에탄올 추출물 추가 농도에 비례하여 간 조직의 TNF α 수준이 감소하였으며, E+HCS군의 경우 E군에 비해 유의적으로 감소하였고 C군과는 유의적인 차이가 없었다. 또한, 염증 반응을 조절하는 NF κ B의 활성 정도를 나타내는 p-NF κ B 단백질을 살펴본 결과, E+LCS군과

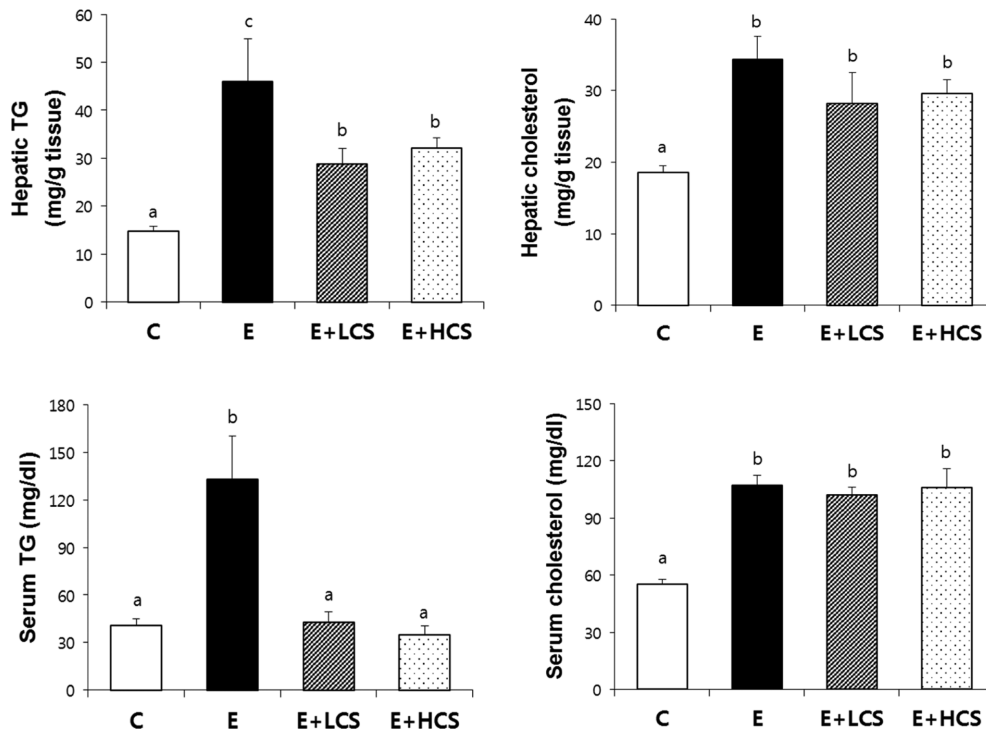


Fig. 4. Effects of *Cirsium setidens* ethanol extract (CS) on hepatic and serum TG and cholesterol concentrations in ethanol-fed rats. C: control diet, E: ethanol diet, E+LCS: ethanol diet with 100 mg/kg BW CS, and E+HCS: ethanol diet with 500 mg/kg BW CS. Data are the means \pm SE (n = 7). Different letter indicate significant difference (p < 0.05).

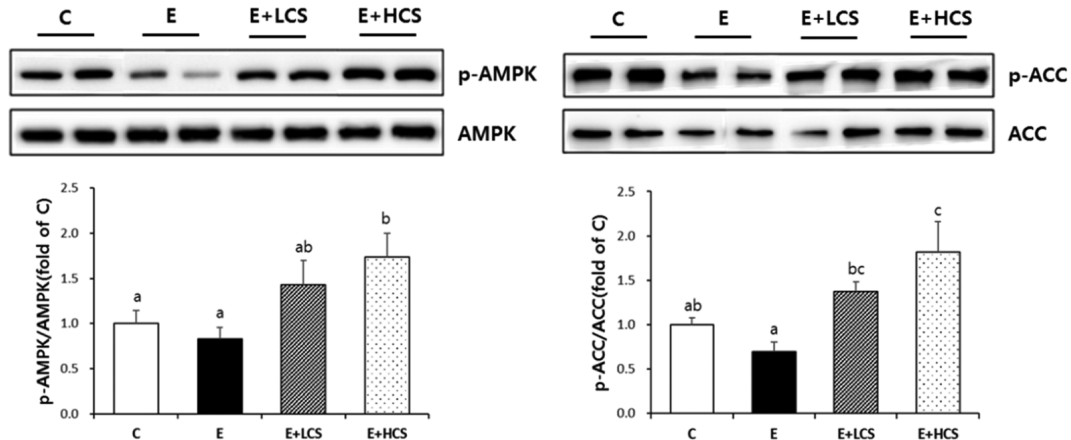


Fig. 5. Effects of *Cirsium setidens* ethanol extract (CS) on the protein levels of phosphorylated-AMPK and phosphorylated-ACC in the liver tissue of ethanol-fed rats. C: control diet, E: ethanol diet, E+LCS: ethanol diet with 100 mg/kg BW CS, and E+HCS: ethanol diet with 500 mg/kg BW CS. Data are the means \pm SE (n = 7). Different letter indicate significant difference (p < 0.05).

E+HSC군에서 모두 E군에 비해 p-NF κ B 수준이 유의적으로 낮게 나타났다.

고 찰

알코올성 지방간은 만성적인 과도한 알코올 섭취 시 나타나는 초기 증상으로 만성 간질환의 주요 원인 중의 하나

이다. 본 연구에서는 여러 플라보노이드를 함유하고 있는 곤드레 에탄올 추출물이 알코올성 지방간의 유발 및 그로 인한 간 손상에 미치는 영향을 알아보기로 수행되었다.

본 연구에서는 알코올을 6.4% (v/v) 농도로 함유한 Lieber-DeCarli 액체 식이를 사용하여 만성적인 알코올 섭취 시 나타나는 알코올성 지방간을 유도하였다. Lieber-DeCarli 액체 식이를 사용하는 경우 별도의 식수 공급이 없으므로

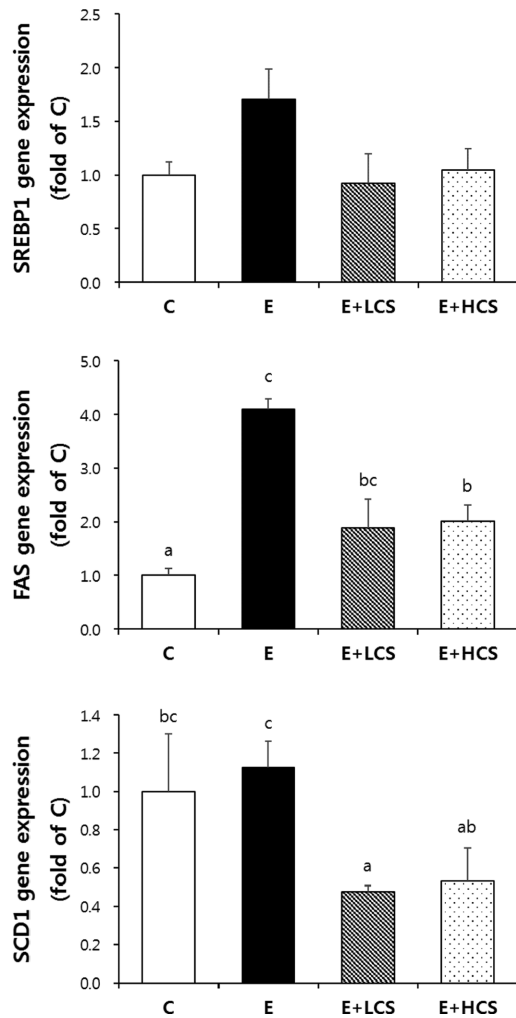


Fig. 6. Effects of *Cirsium setidens* ethanol extract (CS) on the mRNA levels of SREBP1, FAS, and SCD1 in the liver tissue of ethanol-fed rats. C: control diet, E: ethanol diet, E+LCS: ethanol diet with 100 mg/kg BW CS, and E+HCS: ethanol diet with 500 mg/kg BW CS. Data are the means \pm SE (n = 7). Different letter indicate significant difference (p < 0.05).

알코올 섭취량을 늘릴 수 있고, 이로 인해 지속적으로 혈중 알코올 농도를 높게 유지시킬 수 있다.¹⁹ 또한, 알코올 투여군은 정상 대조군에 비해 혈청 AST와 혈청 ALT 농도가 유의적으로 높게 나타나 알코올로 인한 간 손상이 유발되었고, pro-inflammatory cytokine인 TNF α 의 간 조직에서의 발현이 증가하는 등 알코올에 의한 염증 증가가 관찰되었다. 한편, 알코올과 동시에 곤드레 알코올 추출물을 식이에 공급한 경우, 간 조직의 알코올에 의한 지방간 증가가 현저하게 감소되었으며 간 조직과 혈청에서의 알코올에 의한 중성지방 농도의 증가도 유의적으로 억제되었다. 본 연구에서 사용한 곤드레 알코올 추출물의 용량인 100 mg/kg과 500 mg/kg의 두 가지 농도 모두에서 지방간 발생 억

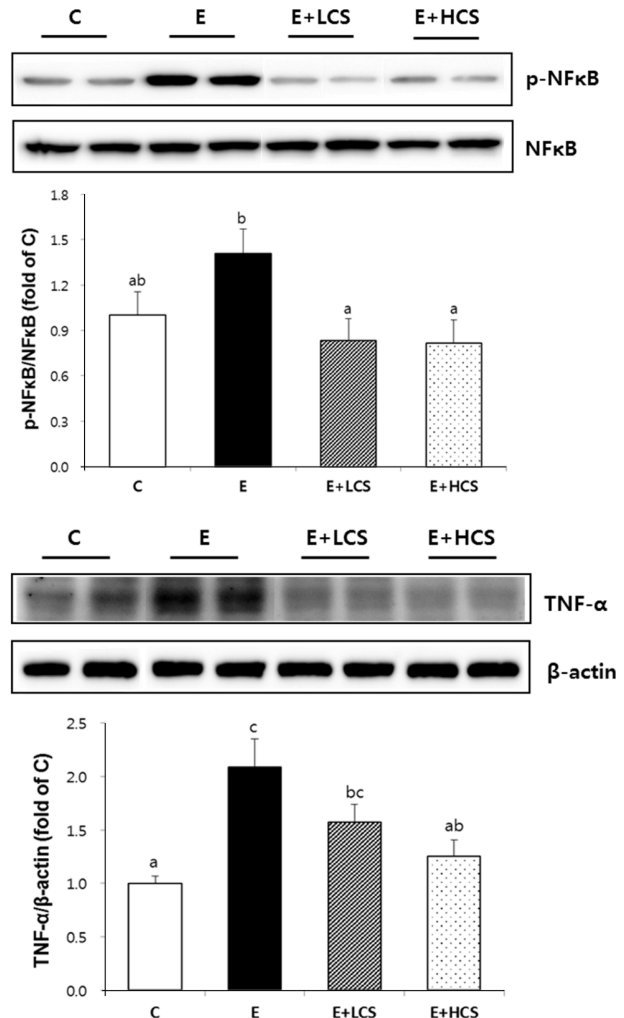


Fig. 7. Effects of *Cirsium setidens* ethanol extract (CS) on the protein levels of phosphorylated-NFκB and TNF α in the liver tissue of ethanol-fed rats. C: control diet, E: ethanol diet, E+LCS: ethanol diet with 100 mg/kg BW CS, and E+HCS: ethanol diet with 500 mg/kg BW CS. Data are the means \pm SE (n = 7). Different letter indicate significant difference (p < 0.05).

제 효과가 나타났으며, 농도 의존적인 차이는 없었다. 이는 낮은 농도인 100 mg/kgBW으로도 정상 대조군의 수준으로 지방간 발생이 억제되었으므로 더 높은 농도에 의한 추가적인 변화를 살펴볼 수 없었던 것으로 생각된다.

만성적인 알코올 섭취로 인해 나타나는 간 조직의 지방 축적의 원인으로 여러 가지 대사 변화가 제안되고 있으며, 특히 간 세포의 지질 합성 (lipogenesis)의 증가가 필수적으로 동반된다.²⁰ AMPK는 간 조직을 비롯하여 많은 조직에서 지질 대사를 조절하는 데에 중추적인 역할을 하는데,²¹ AMPK는 serine/threonine kinase의 일종으로 하나의 촉매 단위 (α -unit)와 두 개의 조절 단위 (β -unit과 γ -unit)로 이루어져 있으며, α -unit의 인산화에 의해 활성화된다. 이때

AMPK의 활성화는 지방산 합성 효소인 ACC를 인산화시키는 것으로 알려져 있다.²² ACC는 지방산 합성의 첫 단계이며 속도 조절 단계 (rate-limiting step)인 acetyl-CoA의 malonyl-CoA로의 전환을 촉매 하는 효소이며, 인산화에 의해 활성이 억제된다.²³ 본 연구의 결과, 식이 중 곤드레 에탄올 추출물 함유량이 높을수록 간 조직에서의 인산화된 AMPK 단백질 (phosphorylated-AMPK)의 수준이 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 곤드레 에탄올 추출물을 투여한 군에서는 에탄올 단독 투여군에 비해 AMPK의 downstream 표적 단백질인 ACC의 인산화를 유의적으로 증가시켰다. 따라서 곤드레 에탄올 추출물에 의한 AMPK의 활성 증가는 ACC의 인산화를 통해 ACC 효소의 활성을 억제하여 간 조직에서의 지방산 합성 억제에 기여하는 것으로 보인다. Noh 등²⁴의 연구에 따르면, 고지방식이를 공급한 마우스 모델에서 곤드레 에탄올 추출물의 식이 보충이 간 조직에서의 AMPK의 인산화를 증가시키고 고지방식이에 의한 비알코올성 지방간의 발생이 억제됨이 보고된 바 있어 본 연구 결과를 뒷받침한다. 또한, 3T3-L1 세포를 이용한 *in vitro* 연구에서 곤드레 추출물의 처리는 지방 세포의 분화와 지방구 축적을 억제하는 것으로 나타나,²⁵ 곤드레 추출물의 지방 축적 억제 효과는 특정 조직에 국한되지 않는 것으로 생각되며, 곤드레 추출물 중 어떤 특정 성분이 지질 대사를 조절하는 역할을 하는지에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 보인다.

또한, AMPK의 활성화는 ACC 활성 억제와 함께, SREBP1, FAS, SCD1 등 지질합성에 관여하는 여러 유전자의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다.²⁶ 본 연구에서도 곤드레 에탄올 추출물에 의한 AMPK 활성화는 FAS와 SCD1 유전자 발현을 유의적으로 억제하는 것으로 나타나, 곤드레 에탄올 추출물이 AMPK-의존 신호 전달 체계를 유의적으로 변화시킴을 제시한다.

한편, 본 연구에서 저농도의 곤드레 에탄올 추출물 투여군의 경우 AMPK 활성화에는 유의적인 변화가 없었으나, 지방간은 정상 수준으로 회복됨을 보였다. 이는 곤드레 에탄올 추출물의 지방간 개선 효과가 AMPK 활성 조절과 함께 다른 기전이 복합적으로 작용하였을 가능성을 제시한다. 한 예로, 알코올은 NAD⁺-의존 탈아세틸화 효소인 sirtuin 1 (SIRT1)의 활성 억제를 통해 지방간 발생을 촉진함이 보고된 바 있다.²⁷ 추후 곤드레 에탄올 추출물의 SIRT1의 활성 및 관련 유전자 발현 조절에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

알코올성 지방간과 동반되는 간 손상의 지표로는 혈청 AST 및 혈청 ALT의 활성 증가와 간 조직에서의 TNF α 의 발현 증가가 대표적이다. 본 연구에서 곤드레 에탄올 추출

물의 섭취는 알코올에 의한 혈청 AST와 혈청 ALT 농도 증가를 유의적으로 억제하여 정상 대조군의 수준으로 낮추었으며, 간 조직에서의 TNF α 단백질 수준을 농도 의존적으로 감소시켰다. 만성적인 알코올 섭취는 간 대식 세포의 NF κ B를 활성 증가를 통해 TNF α 의 발현 및 분비를 촉진하고, 알코올성 간 손상을 가속화하는 것으로 알려져 있다.^{28,29} 흥미롭게도 본 연구에서 곤드레 에탄올 추출물을 공급한 경우 간 조직의 활성형 NF κ B (phosphorylated-NF κ B)의 수준을 알코올만 단독으로 공급한 경우에 비해 거의 절반 수준으로 감소시키는 것으로 나타났다. NF κ B가 염증성 반응을 조절하는 과정의 중추적인 전사 인자임을 고려할 때 곤드레 추출물의 NF κ B 활성 억제는 알코올성 간 손상을 억제하는 관련 경로를 제시한다. 기존의 몇몇 연구에서 CCl₄ 혹은 D-galactosamine 등으로 유도된 간 손상 모델을 사용하여 곤드레 추출물의 간 손상으로부터의 억제 효과가 일부 보고되었으나, 그 작용 기전으로는 대부분 곤드레 플라보노이드의 항산화 활성으로 제한되어 연구된 바 있다.^{14,30} 본 연구 결과 나타난 곤드레 에탄올 추출물의 NF κ B 활성 억제 효과는 곤드레 추출물의 또 다른 새로운 생리 활성을 제시한다. 곤드레에는 pectolinarin, luteolin, hispidulin, apigenin 등의 여러 플라보노이드가 함유되어 있으며, 다른 엉겅퀴류 (*Cirsium* 속 식물)에 비해 특히 pectolinarin의 함유량이 높다.⁸ 추후 pectolinarin의 항염증 활성에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 연구가 요구되며, 염증성 반응을 동반하는 비만, 당뇨 등의 질병에서의 곤드레 추출물 또는 pectolinarin의 질병 발생 억제 또는 증상 완화를 살펴보는 것도 의의가 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과, 흰 쥐 동물 모델에서 곤드레 에탄올 추출물 100 mg/kg 투여는 알코올에 의한 지방간 발생 및 이로 인한 간 손상을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다. 미국 FDA의 가이드라인에 따르면^{31,32} 동물 실험에서 사용된 용량을 인체에 올바르게 적용하기 위해서는 해당 실험 동물의 체표면적을 고려한 계산법을 사용할 것을 권장하고 있다 [인체 해당 용량 (human equivalent dose) (mg/kg) = 실험동물 용량 (animal dose) (mg/kg) * 실험동물의 Km factor/인체의 Km factor]. 이때 Km factor는 체중 (kg)을 체표면적 (m²)으로 나눈 값으로, 사람과 랫트의 Km factor는 각각 37과 6이다. 이들 값을 대입하여 본 연구에 사용된 곤드레 에탄올 추출량을 성인 체중인 60 kg 인체에 해당하는 양으로 환산하면 하루 972.97 mg (= 100 mg/kg \times 6/37 \times 60 kg)이 된다. 건조 곤드레에서 곤드레 알코올 추출물의 수율이 18.3%였음을 고려하면, 이는 건조 곤드레 약 5.3 g에 해당하며 일상 식이에서 쉽게 섭취할 수 있는 수준이다. 따라서 본 실험 연구에서 사용된 용량은 인체

에 충분히 적용될 수 있는 용량인 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 Sprague-Dawley 중 흰 쥐 수컷을 정상 대조군 (C), 알코올 군 (E), 알코올 + 100 mg/kgBW 곤드레 에탄올 추출물군 (E+LCS), 알코올 + 500 mg/kgBW 곤드레 에탄올 추출물군 (E+HCS)으로 나누어 Lieber-DeCarli control diet 혹은 Lieber-DeCarli ethanol diet를 8주간 공급하였으며, 이때 곤드레 에탄올 추출물은 액상 사료에 직접 섞어 공급하였다. 알코올과 곤드레 에탄올 추출물의 식이 공급 종료 후 간 조직의 지방구 축적 정도를 살펴본 결과, E+LCS군과 E+HSC군은 E군에 비해 지방간 발생이 유의적으로 억제되었으며, 정상 대조군인 C군과 유의적인 차이가 없었다. 이와 비슷하게, 곤드레 에탄올 추출물의 공급은 알코올에 의해 증가된 간 조직과 혈청의 중성지방 농도를 유의적으로 낮추었으며, 혈청 AST와 혈청 ALT 활성도 정상 대조군 수준으로 회복시키는 것으로 나타났다. 한편, 곤드레 에탄올 추출물의 공급은 p-AMPK와 p-ACC 단백질 수준을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 두 단백질 모두 E군에 비해 E+HSC군에서 유의적으로 높게 나타났다. 또한 FAS mRNA와 SCD1 mRNA 수준은 E군에 비해 E+HSC군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 곤드레 에탄올 추출물은 간 조직에서 알코올 공급에 의해 증가된 NFκB의 활성을 유의적으로 낮추었으며, NFκB의 표적 단백질인 TNFα 단백질 수준을 농도 의존적으로 낮추었다. 본 연구 결과를 통해 곤드레는 알코올에 의한 지방간 발생 및 관련된 간 손상을 유의적으로 억제할 수 있음을 확인하였으며 이 과정에서 AMPK 활성 증가와 NFκB 활성 억제에 관여함을 제시하였다.

References

1. Ministry of Health and Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korea Health Statistics 2013: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-1). Cheongju: Korea Centers for Disease Control and Prevention; 2014.
2. Lee SM, Yoon DY, Paik JH, Hyun KR, Kang HR. Socioeconomic impacts of major health risk factor and effectiveness evaluation of regulatory policy report. Seoul: National Health Insurance Service; 2015.
3. Purohit V, Gao B, Song BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(2): 191-205.
4. Deleuran T, Grønbaek H, Vilstrup H, Jepsen P. Cirrhosis and mortality risks of biopsy-verified alcoholic pure steatosis and steatohepatitis: a nationwide registry-based study. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35(11): 1336-1342.
5. Hafliadottir S, Jonasson JG, Norland H, Einarsdottir SO, Kleiner DE, Lund SH, Björnsson ES. Long-term follow-up and liver-related death rate in patients with non-alcoholic and alcoholic related fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2014; 14(1): 166.
6. Lee WB, Kwon HC, Cho OR, Lee KC, Choi SU, Baek NI, Lee KR. Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Arch Pharm Res* 2002; 25(5): 628-635.
7. Lee SH, Jin YS, Heo SI, Shim TH, Sa JH, Choi DS, Wang MH. Composition analysis and antioxidative activity from different organs of *Cirsium setidens* Nakai. *Korean J Food Sci Technol* 2006; 38(4): 571-6.
8. Thao NT, Cuong TD, Hung TM, Lee JH, Na M, Son JK, Jung HJ, Fang Z, Woo MH, Choi JS, Min BS. Simultaneous determination of bioactive flavonoids in some selected Korean thistles by high-performance liquid chromatography. *Arch Pharm Res* 2011; 34(3): 455-461.
9. Jeong DM, Jung HA, Choi JS. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Arch Pharm Res* 2008; 31(1): 28-33.
10. Lee JH, Jung HK, Han YS, Yoon YM, Yun CW, Sun HY, Cho HW, Lee SH. Antioxidant effects of *Cirsium setidens* extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 2016; 14(4): 3777-3784.
11. Chung MJ, Lee S, Park YI, Lee J, Kwon KH. Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from *Cirsium setidens* and *Aster scaber* in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells. *Life Sci* 2016; 148: 173-182.
12. Ahn MJ, Hur SJ, Kim EH, Lee SH, Shin JS, Kim MK, Uchizono JA, Whang WK, Kim DS. Scopoletin from *Cirsium setidens* Increases Melanin Synthesis via CREB phosphorylation in B16F10 cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18(4): 307-311.
13. Yoo YM, Nam JH, Kim MY, Choi J, Park HJ. Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-galactosamine via an antioxidant mechanism. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(4): 760-764.
14. Yoo YM, Nam JH, Kim MY, Choi J, Park HJ. Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-galactosamine via an antioxidant mechanism. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(4): 760-764.
15. Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 2006; 116(7): 1776-1783.
16. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007; 100(3): 328-341.
17. You M, Matsumoto M, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology* 2004; 127(6): 1798-1808.
18. García-Villafranca J, Guillén A, Castro J. Ethanol consumption impairs regulation of fatty acid metabolism by decreasing the activity of AMP-activated protein kinase in rat liver. *Biochimie* 2008; 90(3): 460-466.
19. Mathews S, Xu M, Wang H, Bertola A, Gao B. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;

- 306(10): G819-G823.
20. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev* 2009; 89(3): 1025-1278.
21. Noh H, Lee H, Kim E, Mu L, Rhee YK, Cho CW, Chung J. Inhibitory effect of a *Cirsium setidens* extract on hepatic fat accumulation in mice fed a high-fat diet via the induction of fatty acid beta-oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77(7): 1424-1429.
22. Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F. Targeting the AMPK pathway for the treatment of type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14: 3380-3400.
23. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev* 2009; 89(3): 1025-1078.
24. Noh H, Lee H, Kim E, Mu L, Rhee YK, Cho CW, Chung J. Inhibitory effect of a *Cirsium setidens* extract on hepatic fat accumulation in mice fed a high-fat diet via the induction of fatty acid beta-oxidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77(7): 1424-1429.
25. Lee YJ, Kim DB, Lee JS, Cho JH, Kim BK, Choi HS, Lee BY, Lee OH. Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea. *Molecules* 2013; 18(10): 12937-12950.
26. Ding RB, Tian K, Huang LL, He CW, Jiang Y, Wang YT, Wan JB. Herbal medicines for the prevention of alcoholic liver disease: a review. *J Ethnopharmacol* 2012; 144(3): 457-465.
27. You M, Liang X, Ajmo JM, Ness GC. Involvement of mammalian sirtuin 1 in the action of ethanol in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294(4): G892-G898.
28. Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* 2007; 32(5): 453-468.
29. McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 2002; 27(1): 53-61.
30. Lee SH, Heo SI, Li L, Lee MJ, Wang MH. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Cirsium setidens* Nakai against CCl₄-induced liver damage. *Am J Chin Med* 2008; 36(1): 107-114.
31. U.S. Department of Health & Human Services, U.S. Food & Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (US). Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Rockville (MD): Center for Drug Evaluation and Research; 2005.
32. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22(3): 659-661.