

발간등록번호
안내서-0133-03



건강기능식품 기능성 평가 가이드

[민원인 안내서]

- 간 건강 관련 -

2025. 7.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(간 건강 관련)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서 · 안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞ 지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞ 안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2025년 7 월 일 담당자 확 인(부서장) 이 순 호		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2020년 9월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구과로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4431

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2015-1-010	2015.12.	제정
2	안내서-0133-01	2017.6.1.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.)
3	안내서-0133-02	2020.9.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)
4	안내서-0133-03	2025.7	개정 (기능성 내용 등 수정)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 I 서 론	5
 II 일반적 사항	5
1. 개요	5
2. 보건학적 중요성	25
 III 기능성 시험 방법	26
1. 바이오마커의 선정	26
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	43
3. 시험 설계 시 고려사항	56
 IV 참고문헌	64

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

「건강기능식품에 관한 법률」 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 가능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이
상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우
인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과
간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에
의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의
기여나 기능향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 경우 인정

약 어

ACC	Acetyl CoA carboxylase
ACL	ATP citrate lyase
ADH	Alcohol dehydrogenase
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AMPK	AMP-activated protein kinase
apo B	Apolipoprotein B
AST	Aspartate aminotransferase
ATP	Adenosine triphosphate
AUC	Area under the curve
Bax	Bcl-2-associated X protein
CAT	Catalase
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CFS	Chalder fatigue scale
CIS	Checklist individual strength
CMR	Caffeine metabolic ratio
CPT-1	Carnitine palmitoyl transferase-1
CT	Computed tomography
CYP	Cytochrome P450
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
DEXA	Dual energy X-ray absorptiometry
EGF	Epidermal growth factor
ET-1	Endothelin-1
FAS	Fatty acid synthase
FAT	Fatty acid translocase
FSS	Fatigue severity scale
GGT	γ -glutamyltransferase
GPAT	Glycerol-3 phosphate acyltransferase
GPx	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione S-transferases
HAKs	4-hydroxyl-2,3,-alkenals
HDL	High density lipoproteins

HGF	Hepatic growth factor
HNE	4-hydroxyl-2,2-nonenal
HOMA-IR	Homeostasis model assesment of insulin resistance
HSCs	Hepatic stellate cells
HSL	Hormone sensitive lipase
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
LCAT	Lecithin cholesterol acyltransferase
LCFAs	Long chain fatty acid
LDL	Low density lipoproteins
LPS	Lipopolysacchride
LSECs	Liver sinusoidal endothelial cells
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MDA	Malondialdehyde
ME	Malic enzymes
MEOS	Microsomal ethanol-oxidizing system
MRI	Magnetic resonance imaging
MROD	Methoxyresorufin O-dealkylase
MRS	Magnetic resonance spectroscopy
MS	Methionine synthase
MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	Reduced NAD
NAFLD	Non alcoholic fatty liver disease
NAT	N-acetyl transferase
NF- κ B	Nuclear factor kappa β
PDGF	Platelet-derived growth factor
PPAR- α	Peroxisome proliferator-activated receptor- α
SCD	Stearoyl CoA desaturase
SOD	Superoxide dismutase
SREBP-1c	Sterol regulatory Element binding protein-1c
T3	Triiodothyronine
TBA	Total bile acids
TGF- β	Transforming growth factor- β
TLR 4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
UGTs	Uridine diphosphate-glucuronosyl transferases
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLCFAs	Very long chain fatty acids
VLDL	Very low density lipoproteins
XO	Xanthine oxidase

I 서론

이 가이드라인은 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(간 건강 관련)에 대한 바이오마커 등의 정보를 제공함으로써 산업체의 기능성 원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II 일반적 사항

1. 개요

간 질환은 지방간, 급·만성간염, 간경변증, 간암 등의 임상 양상으로 나타난다, 간염바이러스, 알코올, 대사이상, 독성물질 (약물 등), 자가면역질환, 유전질환 등 다양한 원인이 있지만 어떤 원인이든 조절되지 않고 오랜 시간 염증을 유발하여 간 섬유화가 진행된다면 간경변증과 간암으로 진행할 위험이 커진다. 그 중 대사이상 지방간질환 및 알코올 간질환은 간내 지방 축적을 포함한 일련의 기전을 통해 간 질환의 발생 및 진행이 일어날 수 있다.

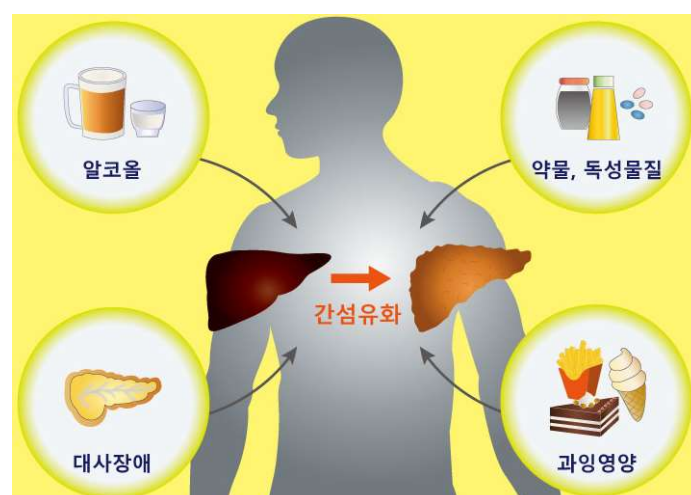


그림 1. 간 손상의 원인과 진행

[출처: Modified from Weiskirchen et al, F1000Res.
27;7. pii: F1000 Faculty Rev-921, 2018]

가. 간의 구조와 기능

간(liver)은 체내에서 가장 큰 기관으로 무게는 성인 체중의 1.8~3.1% 정도인 1.2~1.5kg이다. 구조를 보면 우엽과 좌엽으로 나뉘며, 우엽이 좌엽 보다 2배가량 크다. 간의 아래쪽 중앙부에는 간문부(hepatic portal)라는 움푹 팬 부분이 있으며, 이곳을 통해 간동맥, 간문맥, 담관 및 림프관이 간으로 연결된다. 간은 체내 총 혈액량의 10~15% 정도를 보유하고 있는 혈액 저장고이며, 약 1,500 mL/sec의 속도로 혈액이 이동된다. 간으로 유입된 혈액은 간세포 사이를 흐른 후 간소엽 중앙에 위치한 중심 정맥을 지나 간정맥으로 모여 심장으로 이동한다. 이러한 구조적 특성으로 인해 간은 에너지 및 영양소 대사, 담즙의 합성, 빌리루빈 대사, 혈액응고, 약물 및 독소의 해독 등 체내 대사의 중추적 역할을 수행할 수 있다.

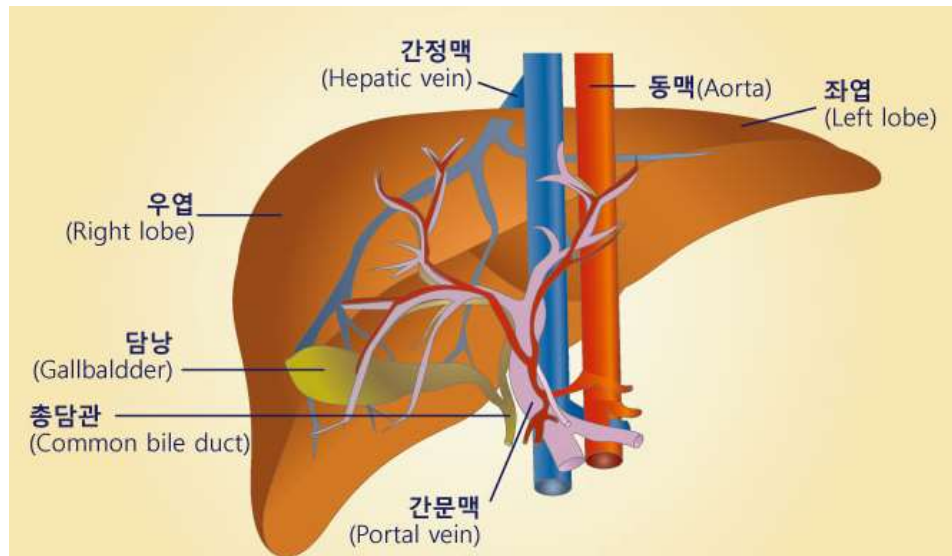


그림 2. 간의 구조

[출처: <http://www.amc.seoul.kr/asan/healthinfo/body/bodyDetail.do?bodyId=1>]

(1) 간의 주요 기능

(가) 주요 영양소의 대사 기능(Metabolic function)

① 탄수화물 대사

섭취한 탄수화물은 소장에서 분해, 흡수되어 간문맥(hepatic portal vein)을 통해 일차적으로 간으로 유입되는데, 간은 혈중 포도당 수준을 일정하게 유지시켜주는 중추적 역할을 한다. 이때 여러 종류의 호르몬이 관여하는데 혈당 수준이 높아져 인슐린이 증가되면 간에서는

글리코겐합성과정(glycogenesis)을 통해 간으로 유입된 6탄당(hexose), 예를 들어 과당(fructose), 갈락토오스(galactose) 등을 모두 포도당으로 변환시켜 글리코겐 형태로 저장한다. 또한, 혈당이 떨어지면, 함께 분비되는 글루카곤(glucagon)에 의해 저장된 글리코겐이 포도당으로 변환되어 혈중 포도당 농도를 증가시킨다. 글리코겐 분해를 촉진하는 호르몬으로는 아드레날린(adrenaline), 코르티솔(cortisol)도 있다. 혈중 포도당 수준이 낮은 상태에서 간에 저장된 글리코겐이 고갈될 경우에는 시상하부에서 이를 인지하여 부신피질(adrenal cortex)에서 코르티솔(cortisol)이 분비되는 것을 촉진하여 아미노산(amino acids), 글리세롤(glycerol), 젖산(lactic acid) 등을 이용하여 포도당 신생 합성(gluconeogenesis)과정을 거친다.

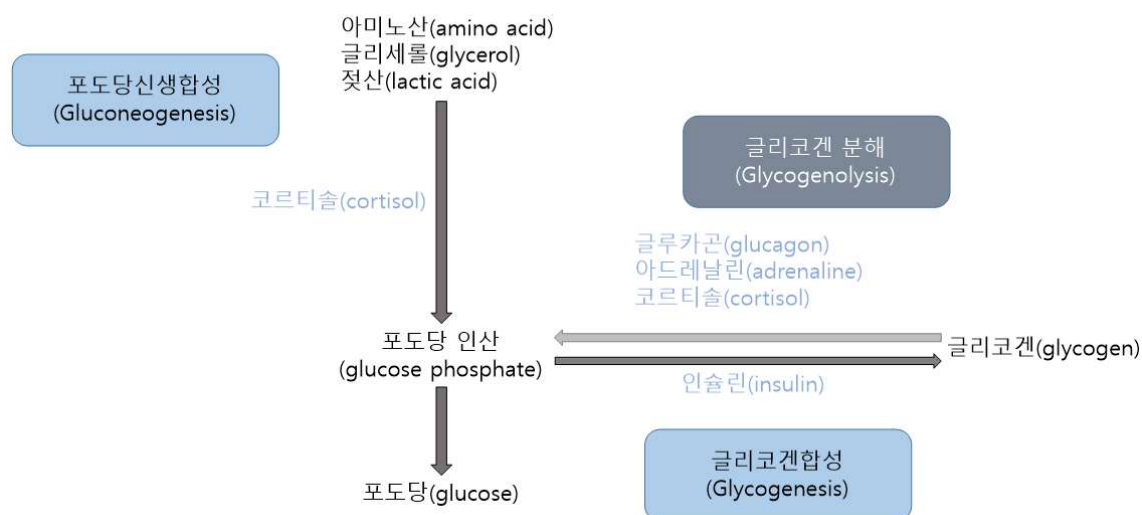


그림 3. 간에서의 탄수화물 대사

[출처: 식품의약품안전평가원, 2015]

② 지질 대사

간에서는 과잉된 탄수화물의 지방 전환 및 콜레스테롤 합성이 일어나며, 체내 지질 이동을 가능하게 하는 지단백질(lipoproteins)을 합성하고 분해하는 곳이기도 하다. 지질은 비극성의 소수성 물질이므로 수용성인 혈액을 통해 운반되기 어렵다. 하지만 지단백질은 지질 및 콜레스테롤이 존재하는 중심부분(소수성부분)으로 구성되어 있으나, 외부 표면은 수용성인 단백질로 둘러싸여 있어 혈액 내 지질의 운반을 도와준다. 지단백질은 밀도와 구성성분에 따라 키로마이크론(chylomicrons), very low density lipoproteins(VLDL), low density lipoproteins(LDL), high density lipoproteins(HDL)로 구분된다.

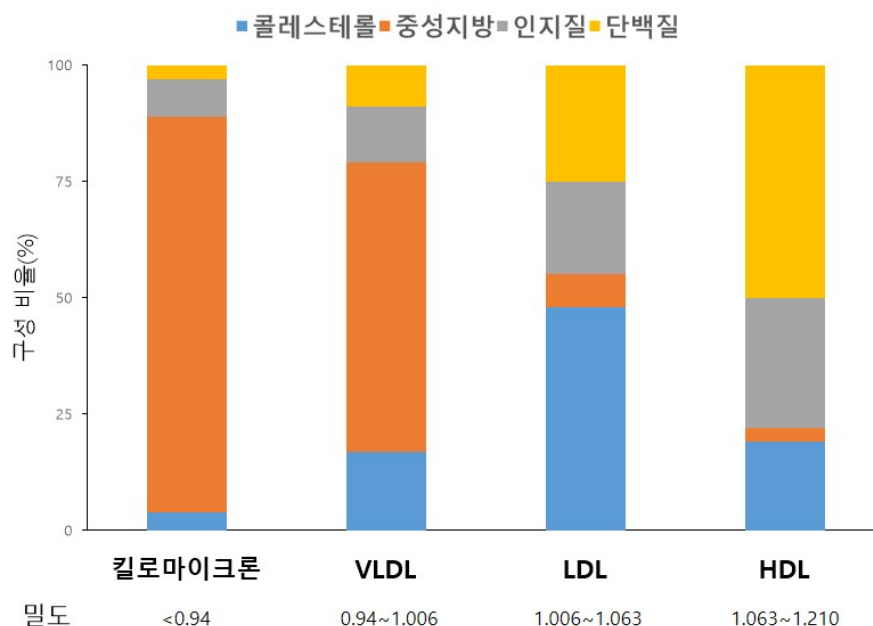


그림 4. 지단백질의 밀도 및 구성

[출처: 고급영양학(일부수정), 2016]

③ 단백질 대사

간에서 필요 이상의 아미노산은 분해되는데, 이 과정에서 생성되는 유독한 암모니아(ammonia)는 오르니틴회로(ornithine cyclic reaction)를 통해 최종 분해산물인 요소(urea)로 전환되어 체외로 배설된다. 즉 단백질 분해 시 생성되는 유독물질을 해독하는 역할을 한다. 또한, 간에서는 알부민(albumin), 글로불린(globulin), 피브리노겐(fibrinogen)과 같은 혈중 단백질이 합성된다. 알부민은 혈관 내 삼투압을 적절히 유지시켜주는 역할을 하므로 적정량이 간에서 합성되어 혈중에 존재해야 하며, 칼슘, 담즙산염(bile salts), 일부 스테로이드 호르몬을 운반해주는 중요한 역할을 한다. 글로불린은 인슐린이나 티록신(thyroxine)과 같은 호르몬, 콜레스테롤, 지질, 철분, 비타민류 등을 운반하는 역할을 한다.

(나) 담즙 분비(Secretion of bile)

간에서는 지방 소화를 돕는 담즙(bile)의 구성성분, 즉 담즙산(bile acids), 콜레스테롤, 인지질(phospholipids), 결합 빌리루빈(conjugated bilirubin)이 합성, 분비되는데 분비된 담즙은 담관을 통해 십이지장으로 배출되어 지방의 소화과정에 관여한다.

(다) 체내 보호 기능(Protection function)

① 생체 이물(xenobiotics) 제거

간은 장에서 유입된 유해한 생체이물(xenobiotics)을 제거하는 주요 기관이다. 독성 화학 물질 대부분은 주로 지용성이기 때문에 물에 녹을 수 없어 체외로 배설되기 어렵고, 지방조직 및 세포막과의 친화성(affinity)이 높아 주로 지방조직에 수년간 축적되어 있다가 체내 상태에 따라 조직에서 분비될 수 있다. 생체 이물이 간에서 대사되는 과정은 매우 복잡한 일련의 반응, 즉 phase I, phase II 반응을 거치는데, 결과적으로 지용성 독성물질은 수용성 물질로 변환되어 입자 특성에 따라 소변이나 담즙을 통해 배설된다.

② 면역반응(immune response)

장과 간 사이에는 'gut-liver axis'라는 것이 존재하는데, 간문맥으로 유입되는 혈류의 70%는 장에서 유입되므로 간은 장에서 유래된 내독소(endotoxins)에 지속적으로 노출될 수 있다. 소량의 내독소가 혈류로 유입되더라도 간 내 쿠퍼 세포(Kupffer cells)에 존재하는 toll-like receptor 4(TLR 4)에 결합하여 빠르게 제거될 수 있다. 선천성 면역(innate immunity)에 관여하는 중요한 인자들을 합성하고 혈액으로 분비하는 역할을 하는 등 면역방어가 이루어지는 기관이기도 하다.

(2) 간 기능에 관여하는 주요 세포

간에는 3,000억 개 이상의 세포가 존재하는데 실질 세포(parenchymal cells), 즉 간세포(hepatocytes)와 비실질 세포(nonparenchymal cells)로 나뉜다. 비실질 세포로는 굴모양 내피세포(liver sinusoidal endothelial cells), 쿠퍼세포(Kupffer cells), 간 성상세포(hepatic stellate cells), 림프구(lymphocytes) 등이 있다. 여러 연구에 따르면 실질 세포와 비실질 세포들 사이, 또는 비실질 세포들 사이에는 다양한 매개 물질을 통한 세포 간 정보전달이 이루어지며, 이러한 정보전달을 통해 간 기능이 조절되는 것으로 알려져 있다.

(가) 간세포(Hepatocytes)

간 무게의 2/3 정도를 차지하는 주요 세포로 매우 다양하고 복잡한 생리적 기능을 수행한다. 즉, 앞서 언급된 간의 주요 기능 대부분, 즉 탄수화물, 지방, 아미노산 대사, 혈액 단백질 합성, 혈액응고인자, 선천성 면역(innate immunity)에 관여하는 중요한 인자들과 담즙(bile)의 구성성분을 합성하고 분비하는 세포가 바로 간세포이다. 마지막으로 간세포는 질소 대사 과정에서 생성되는 암모니아를 무독하게 만들어주며, 산화 스트레스나 외부로부터 유입된 생체 이물(xenobiotics)에 대한 면역 방어가 이루어지는 곳이기도 하다.

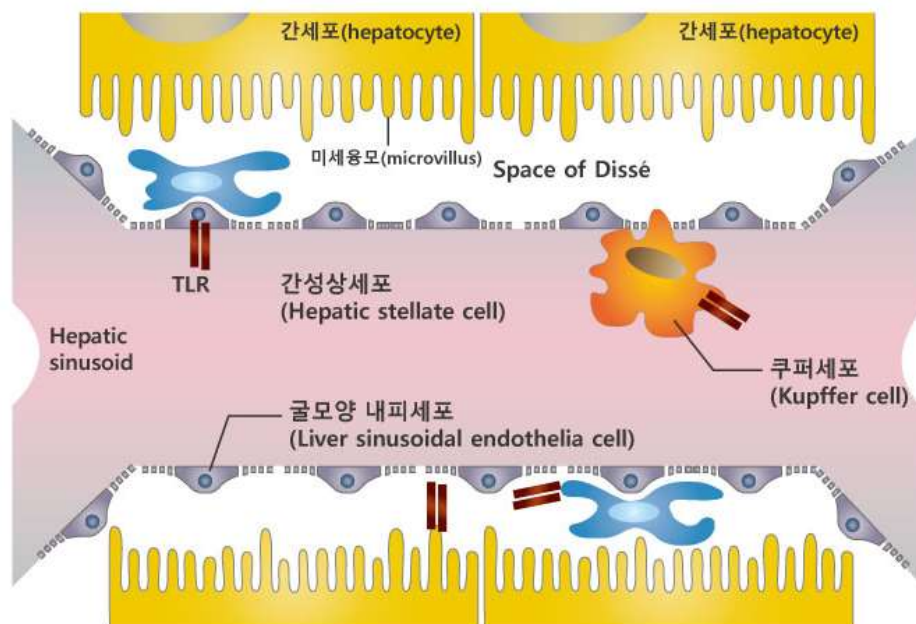


그림 5. 간에 존재하는 주요 세포. TLR: toll-like receptor

[출처: Modified from Protzer et al, Nature Review Immunology 12:201–213, 2012]

(나) 굴모양 내피세포(Liver sinusoidal endothelial cells; LSECs)

LSECs는 다른 조직에 존재하는 내피세포와 구조적으로나 기능적으로 많은 차이가 있는데, 주요 기능은 병원성 인자들의 침입을 막는 장벽을 형성하는 것이다. 장에 존재하는 상당수의 미립자와 수용성 물질들, 예를 들어 식품 항원(food antigens)과 박테리아가 간문맥(portal vein)을 통해 지속적으로 간에 유입됨에도 불구하고 간에는 LSECs와 쿠퍼 세포(kupffer cells)가 존재하기 때문에 이러한 외부 물질이 원활히 제거될 수 있다.

(다) 쿠퍼세포(Kupffer cells)

간에 존재하는 대식세포로서 면역반응에서 중요한 역할을 담당한다. 쿠퍼 세포는 내피세포 벽과 굴모양 혈관(hepatic sinusoid) 내에 존재하며 장으로부터 유입된 물질, 예를 들어 장에서 유래된 박테리아성 내독소(endotoxin)가 간문맥을 통해 간으로 유입되지 못하도록 장간막 혈액(mesenteric blood)을 깨끗하게 하는 역할을 한다. 건강한 사람의 경우에도 낮은 수준이긴 하지만 장내에 박테리아성 내독소에 지속적으로 노출되기 때문에 쿠퍼세포가 다소 활성화되어 있을 수 있다. 하지만 질병 상태에서는 장내 내독소가 장관 장벽(intestinal barrier)에 손상을 주어 간으로 다량 유입되어 쿠퍼세포를 강하게 활성화 시킨다. 쿠퍼 세포도 굴모양 내피세포(LSECs)처럼 식균작용(phagocytic, endocytic activity)을 가지고 있으며, 활성화된 쿠퍼 세포들은 항체 제시 세포 기능을 할 수 있어서 간 내 면역반응 조절에 관여할

수 있다. 쿠퍼 세포는 대식세포 기능 외에도 세포막에 존재하는 포식수용체인 스캐빈저 수용체(scavenger receptor)를 통해 노화되고 손상된 적혈구를 제거하고, 헤모글로빈으로 분해시켜 철분이 재순환되는 데 중요한 역할을 한다.

(라) 간 성상세포(Hepatic stellate cells, HSCs)

간 부피의 1.4 %를 차지하는 세포로 정상 상태에서는 주로 레티노이드(retinoids) 저장에 관여한다. 하지만, 간 손상이 지속되는 경우 활성화되어 근섬유모세포(myofibroblast)로 분화되는데, 섬유화된 간 조직에서 특징적으로 나타나는 결합조직 인자들(connective tissue elements), 즉 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 구조 당단백질(structural glycoproteins), 프로테오글리칸(proteoglycans), 히알루론산(hyaluronan, hyaluronic acid)을 발현, 분비시킬 수 있다. 따라서 간 성상세포의 활성화와 근섬유모세포로의 분화는 쿠퍼 세포(Kupffer cells), 간세포(hepatocyte), 굴모양 내피세포(Liver sinusoidal endothelial cells) 간의 상호작용에 의해 조절되며, 다양한 성장인자(growth factor), 케모카인(chemokines), 활성 산소종(reactive oxygen species) 등에 의해 매개된다. 이들 매개 인자들 중, 형질 전환성장인자(transforming growth factor- β , TGF- β), 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor-1, IGF-1), 엔도텔린-1(endothelin-1, ET-1), 단핵세포 화학유인물질 단백질(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), hepatic growth factor(HGF)가 간 성상세포의 활성화, 분화, 결합조직 생성에 관여하는 주요 인자들이다. 특히, TGF- β 는 간 성상세포가 근섬유모세포로 분화되는 것을 활성화하여 세포외 기질(extracellular matrix) 합성을 자극하며 섬유화를 유발하고, 퇴화를 억제하는 주요한 사이토카인(cytokine)으로서 간세포 사멸을 유도함으로써 간세포 파괴를 촉진한다.

또한, 간 섬유화와 관련하여, 간 성상세포는 쿠퍼 세포와 연계하여 간세포의 재생에도 관여한다. 간이 손상되면, 여러 신호들이 간에서 동시다발적으로 시작되는데, 이때 간에 존재하는 비실질 세포들(쿠퍼 세포, 간 성상세포 등)이 활성화되어 TNF- α 와 IL-6의 생성이 증가된다. 동시에 췌장에서부터 인슐린이 분비되며, 십이지장과 침샘에서는 상피세포증식인자(epidermal growth factor, EGF), 부신(adrenal gland)에서는 노르에피네프린(norepinephrine), 갑상선에서는 T3(triiodothyronine), 간 성상세포에서는 HGF(hepatocyte growth factor) 등이 분비된다. 이들 인자에 의한 통합적 신호가 간세포의 DNA 합성과 증식을 유도함으로써 간세포의 세포주기를 조절하게 된다. TGF에 의한 신호는 간세포의 DNA 합성을 억제하므로 간세포 증식이 필요한 시기에는 작용이 차단되나, 간세포 재생 과정이 마무리되고 간세포가 다시 휴식기로 돌아가야 할 시기에는 기능이 회복된다.

나. 간 손상 기전

(1) 대사이상으로 인한 간 내 지방 축적에 따른 간손상

(가) 영양 과잉으로 인한 간 내 지방축적 증가

정상 간의 경우 지방이 차지하는 비율은 5 % 미만으로 이보다 지방이 많이 축적된 상태(주로 중성지방, 인지질 및 콜레스테롤 에스터가 과량 축적됨)를 지방간이라 한다. 간 내 지방축적 증가를 유발하는 위험인자로 알코올과 비만, 당뇨, 고지혈증 등과 같은 체내 대사 이상을 들 수 있다. 비음주자에게 나타나는 간 손상의 경우 알코올로 인한 것과 구분하여 ‘대사이상’이라는 용어를 사용한다.

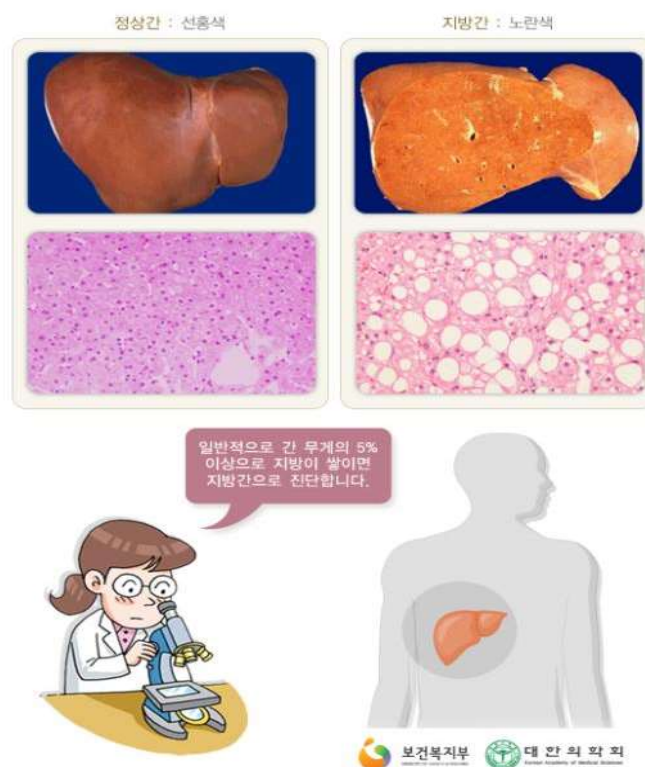


그림 6. 정상간과 지방간

[출처: 국가건강정보포털 <http://health.mw.go.kr>]

일반적으로 탄수화물과 지방은 혈중 포도당과 인슐린에 의해 대사과정이 치밀하게 조절된다. 그러나, 탄수화물 또는 지방의 과잉 섭취로 영양 과잉 상태가 지속될 경우 고혈당이 동반되며, 혈중 유리 지방산(free fatty acid) 수준이 증가된다. 과량의 에너지는 지방축적을 촉진하게 되며, 탄수화물과 지방 대사 이상이 장기화 되면서 인슐린 저항성이 유발되게 된다. 인슐린 저항성이 있는 경우 혈중 인슐린 민감성이 감소되기 때문에 혈중 인슐린 수준은 높게 유지되며,

고혈당 상태가 지속된다. 이러한 상태에서는 지방조직에서 호르몬감수성 지방질가수분해효소(hormone-sensitive lipase) 활성이 증가되어 지방조직의 분해가 촉진되면서 결과적으로 혈중 유리 지방산 농도는 더욱 증가한다. 따라서 영양 과잉으로 인한 지방산 섭취와 지방조직에서 분해된 지방산이 배가되면서 간으로 유입되는 유리 지방산 수준도 비례적으로 증가하게 된다. 간으로 유입된 지방산은 베타-산화(β -oxidation) 과정을 통해 산화되어 에너지원으로 이용될 수도 있고, 중성지방으로 전환되어 간에 축적될 수도 있지만, 고인슐린혈증(hyperinsulinemia)과 고혈당(hyperglycemia)이 지속될 경우에는 지방산 산화가 억제되고, 중성지방 합성이 촉진된다. 즉, 간에서 sterol regulatory element binding protein-1c(SREBP-1c)와 carbohydrate response element binding protein(ChREBP)이 활성화되어 지방산 합성을 촉진하는 유전자 발현이 증가되며, 지방산 합성 증가로 생성되는 말로닐-CoA(malonyl-CoA)가 carnitine palmitoyl transferase-1(CPT-1)의 작용을 억제하여 미토콘드리아에서 지방산 베타-산화를 감소시킨다. 따라서 지방산 산화는 억제되면서 중성지방 합성에 필요한 지방산이 지속적으로 공급되면서 간 내 지방축적이 촉진되는 것이다.

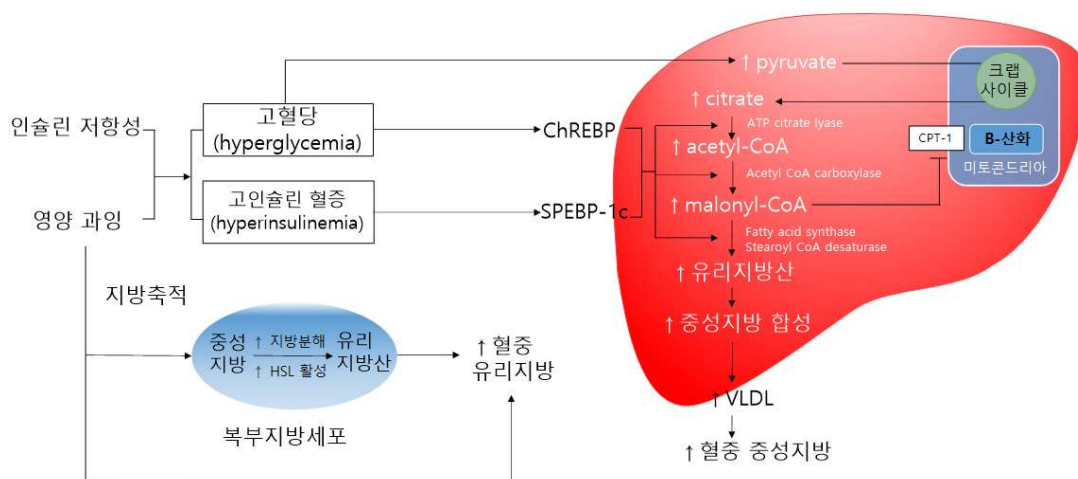


그림 7. 영양 과잉, 인슐린 저항성과 간 내 지방축적

HSL : hormone sensitive lipase, ChREBP : carbohydrate response element binding protein, SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein-1c, ATP : adenosine triphosphate, CPT-1 : Carnitine palmitoyltransferase-1, VLDL : very low density lipoprotein

[Modified from Browning et al. J Clin Invest. 114(2):147-15, 2004]

여러 연구에서 AMP-activated protein kinase(AMPK)가 간 내 지방축적에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. AMPK는 세포내 에너지 수준을 감지하는 역할을 하는 단백질로서 세포 내 에너지 저장량이 감소되면 아데노신 1인산(adenosine monophosphate, AMP) 수준이 증가되면서 간조직 내 AMPK가 활성화된다. 활성화된 AMPK는 지방산 베타-산화를 촉진시키며 지방 합성을 억제하는데, 이로써 간 내 지방축적을 감소시킬 수 있다. 때문에

AMPK 활성을 증진시킬 수 있는 식품 소재의 경우 간 내 지방축적을 억제할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

아디포넥틴(adiponectin)도 간에서 일어나는 다양한 대사 이상들과 관련이 있는데, 혈중 아디포넥틴 농도가 체내 지방 수준과 반비례 관계에 있다고 보고된 바 있다. 혈중에는 다양한 분자량의 아디포넥틴이 존재하는데, 이 중 고분자 아디포넥틴이 생물학적으로 좀 더 활성이 크며, TNF- α (tumor necrosis factor- α)의 발현과 분비, 작용을 억제함으로써 인슐린 민감성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 반대로 TNF- α 는 아디포넥틴의 발현과 분비를 억제한다. 동물시험에서 간 내 아디포넥틴이 미토콘드리아에서 이루어지는 베타-산화를 촉진하고 SREBP-1c 수준을 감소시킴으로써 AMPK, peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR- α)를 활성화시키고, nuclear factor kappa B(NF- κ B)를 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 혈중 아디포넥틴이 증가될 경우 간 내 지방의 축적이 억제될 가능성이 있다.

(나) 간 내 산화 스트레스 증가 및 간세포 손상

지방의 과잉 축적이 만성적 염증 상태를 동반하게 되면 간경변, 간암과 같은 만성 간질환으로 진행될 가능성이 크기 때문에 주의해야 한다. 간 내 만성적 염증 상태가 있는 경우 간세포 팽창(hepatocyte ballooning), 세포 사멸(cell death) 같은 간세포 손상과 염증성 침윤(inflammatory infiltrates), 콜라겐 축적(collagen deposition) 등으로 인한 섬유화가 가속될 수 있다.

간 내 지방축적이 높은 상태가 지속될 경우 염증반응이 진행되는 원인에 대해 ‘two hit’ 모델이 제시되고 있다. 간세포의 세포질에 중성지방이 축적된 것을 첫 번째 타격(first hit)이라 할 수 있는데, 이런 상태에서 산화스트레스가 더 지속될 경우 간은 과도한 염증반응이라는 두 번째 타격(second hit)에 더 민감하게 된다. 두 번째 타격에서 산화 스트레스는 지방이 과량 축적된 간에서 염증반응 증폭될 수 있는 기폭제 역할을 하는데, 이러한 타격이 계속되면 간경화와 같은 간질환이 유발될 수 있다는 이론이다.

지질 대사에서 핵심적 역할을 하는 간세포의 미토콘드리아, 과산화소체(peroxisomes), 마이크로솜(microsomes)에서 지방산의 산화가 일어난다. 길이가 길지 않은 지방산은 미토콘드리아에서 산화되지만 길이가 긴 지방산인 long chain fatty acid(LCFAs)와 very long chain fatty acids(VLCFAs)는 과산화소체와 마이크로솜에서 산화될 수 있다. 길이가 긴 지방산도 과산화소체와 마이크로솜에서 산화되어 길이가 짧아지면, 미토콘드리아에서 짧아진 지방산을 완전히 산화시키므로 미토콘드리아는 지방산 산화에서 아주 주요한 기관이라 할 수 있다. 간세포가 더 이상 지방을 축적할 수 없을 정도로 지방 축적량이 많아지면, 미토콘드리아 내에 유리지방산 수준이 증가되고, 결과적으로 미토콘드리아에서 일어나는 베타-산화가

과도해지면서 과량의 과산화수소(H_2O_2)가 생성된다. 이로써 세포 내 활성산소 및 지질과산화가 증가되어 미토콘드리아의 기능이 손상될 수 있다. 미토콘드리아의 고유 기능인 호흡 연쇄 활성(mitochondrial respiratory chain activity)이 손상되면 활성산소 생성량이 더욱 증가된다. 또한, 세포질 내에 지방산이 축적되면, 과산화소체와 소포체(endoplasmic reticulum)에서도 지방산 산화가 증가되어 과산화수소가 생성된다. 산화과정에서 생성되는 지질 과산화물, 즉 4-hydroxyl-2,2-nonenal(HNE), 4-hydroxyl-2,3-alkenals(HAKs), malondialdehyde(MDA)와 같은 알데히드는 자체적으로 독성을 가지고 있으며, 세포 밖으로 자유롭게 확산되어 멀리 있는 세포에까지 영향을 줄 수 있다. 활성산소와 알데히드류는 산화 스트레스를 유발시켜 아데노신 3인산(adenosine triphosphate, ATP)과 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)의 고갈, DNA와 단백질 손상, 환원형 글루타치온(reduced glutathione) 고갈 등을 통해 세포사멸(cell death)을 유도한다. 또한, 친염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines) 생성을 촉진시켜 염증반응을 유도함으로써 호중구(neutrophil)를 자극시킨다. 결과적으로, 활성산소와 지질 과산화로 인한 대사산물이 간 정상세포(hepatic stellate cells)를 활성화시키고, 콜라겐 합성과 염증반응을 촉진시킴으로써 간 섬유화를 유발할 수 있다. 일반적으로 간섬유증은 간경변과 달리 간손상의 원인이 소실되면 정상 회복이 가능한 가역적인 상태로 얇은 피브릴(fibril)로 구성되며, 결절(nodule)은 형성되어 있지 않다. 하지만 간섬유증 과정이 반복적으로 지속되면 세포외 기질(extracellular matrix) 간의 교차결합(crosslinking)이 증가하고 결절이 형성되는 비가역적인 간경변으로 진행된다.

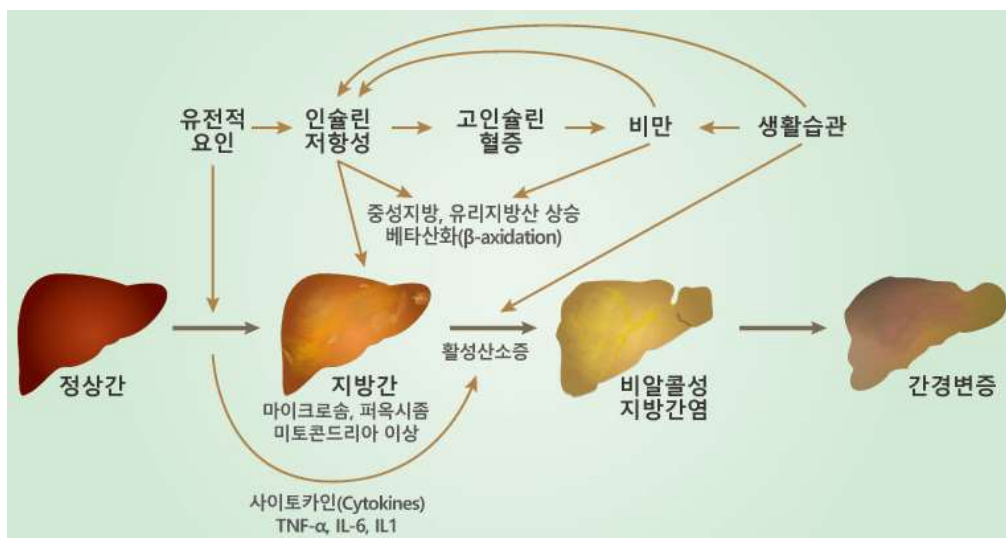


그림 8. 비알코올성 지방간과 산화스트레스

[Modified from Yang et al. *Nutrients* 11:872–908, 2019, *World J Gastroenterol.* 21(41):11552–66, 2015]

(2) 알코올성 간손상

장에서 흡수된 알코올의 90 %는 체내에서 대사되며 나머지 10%는 대사되지 않은 채로 소변, 땀, 땀 등을 통해 체외로 배출된다. 흡수된 알코올의 대부분은 간에서 대사되며, 뇌, 췌장, 위에서도 알코올이 대사되나 간에 비하면 매우 소량에 불과하다.

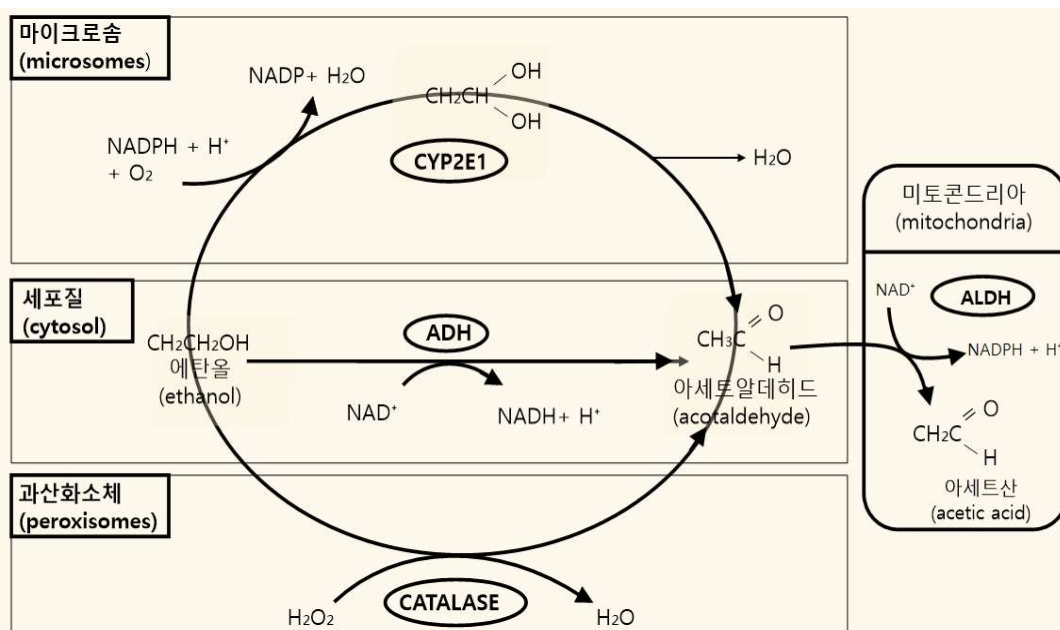


그림 9. 간에서 이루어지는 알코올 대사

CYP2E1 : cytochrome P450 2E1, ADH : alcohol dehydrogenase(알코올 탈수효소),

NAD : nicotinamide adenine dinucleotide, NADH : reduced NAD,

ALDH : aldehyde dehydrogenase(알데히드 탈수효소)

[출처: Alcohol Res Health 29(4):245-254, 2006]

(가) 간 내 알코올 대사과정

알코올을 섭취하면 위장관에서 단순 확산(simple diffusion)에 의해 빠르게 흡수되어 주로 체내 수분과 함께 분포한다. 혈액을 통해 간으로 이동된 알코올은 아세트알데히드(acetaldehyde), 아세테이트(acetate)로 순차적으로 산화된다. 생성된 아세테이트는 혈류로 분비되며 말초 조직에서 이산화탄소와 물로 최종 산화된다. 간 기능이 정상적인 사람들의 경우에는 간에서 알코올 대사과정에 주로 3가지 효소가 관여하는데, 가장 중요한 효소가 바로 세포질에 존재하는 알코올 탈수효소(alcohol dehydrogenase, ADH)로 간기능이 정상인 사람들의 경우 주로 이 효소에 의해 알코올이 대사되며, 알코올 산화로 인해 아세트알데히드와 케톤(ketones)이 생성된다. 알코올이 대사되는 두 번째 경로는 마이크로솜(microsome)에 존재하는 알코올

산화 시스템(microsomal ethanol-oxidizing system, MEOS)인데, 알코올을 과량 섭취했을 때에만 가동된다. 주로 CYP2E1(Cytochrome P450 2E1)이 관여하는데, 알코올을 만성적으로 섭취하는 경우에도 활성이 증가될 수 있다. 세 번째 알코올 산화 경로는 카탈라아제(catalase) 효소에 의해 촉진된다. 이 효소는 대부분의 조직에서 과산화소체(peroxisome)에 존재하는데, 알코올 대사에 대한 기여도는 매우 낮다. 이 세가지 경로를 통해 생성된 아세트알데히드는 간 내 미토콘드리아에서 알데히드탈수효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)에 의해 더 산화되어 아세트산으로 변환된다.

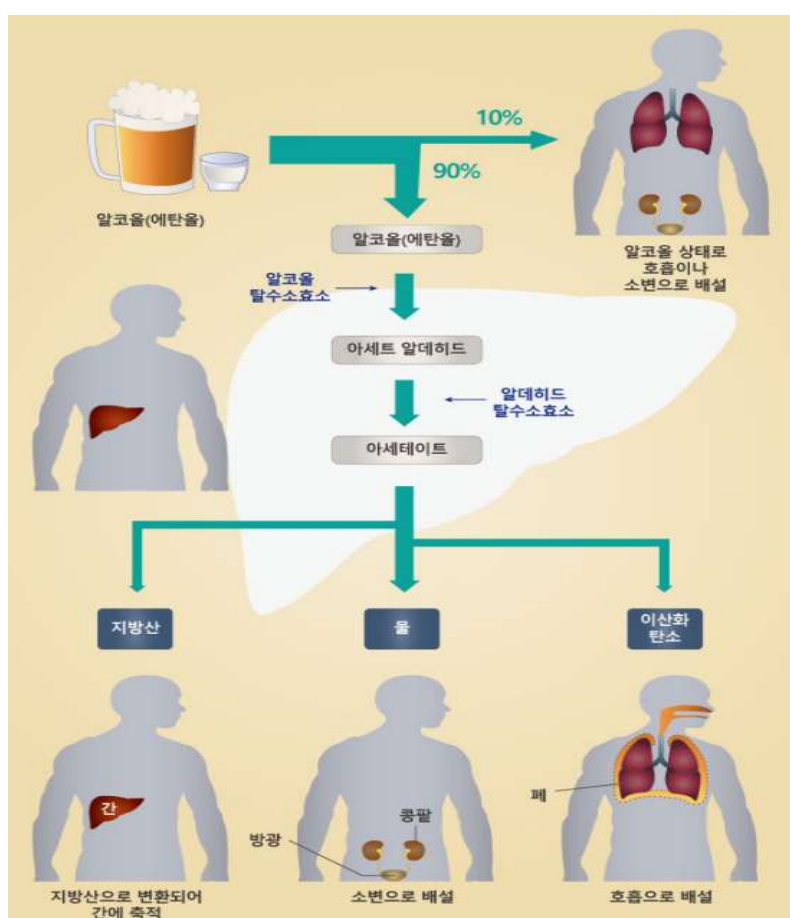


그림 10. 체내에서의 알코올 대사

[출처: 국가건강정보포털 <http://health.mw.go.kr>]

(나) 알코올 대사물: 아세트알데히드

알코올은 간세포의 소포체(ER)와 미토콘드리아 효소인 시토크롬 P450 2E1(CYP2E1)에 의해 산소와 NADPH가 있을 때 아세트알데히드로 대사되고, 이후 아세트에이트로 대사된다. CYP2E1 매개 알코올 대사는 알코올 산화의 대체 경로이며 만성 알코올 소비에 의해 유도된다(그림 16). 아세트알데히드는 독성이 강하고 발암성이 있는데, 단백질에 결합하여 미토콘드리아 및 미세소관의 구조적, 기능적 변화를 일으키고, 면역 반응을 생성할만한 새로운 항원의 형성을 유도할 수 있다. 아세트알데히드로 인해 생성된 미토콘드리아의 구조적 변화는 ATP 생성 감소, 활성산소(ROS) 생성, 미토콘드리아 내 존재하는 아세트알데히드 대사 효소인 아세트알데히드 탈수소효소의 활성 감소 등 기능적 손상을 야기한다.

아세트알데히드가 직접적으로 미치는 독성 효과 외에도 간접적으로 독성을 나타낼 수 있다. 활성산소는 단백질에 결합하여 기능적, 구조적 특성을 변경하고 신생항원을 생성할 수 있다. 또한 4-하이드록시노네알(4-HNE) 및 말론디알데히드(MDA)와 같은 지질 과산화 생성물을 생성하여 DNA에 직접 결합하여 손상을 주거나 지질 과산화를 유발할 수 있다. 이러한 지질 과산화 생성물은 DNA 염기에 결합하여 발암성이 높은 DNA를 생성할 수 있다(그림 16).

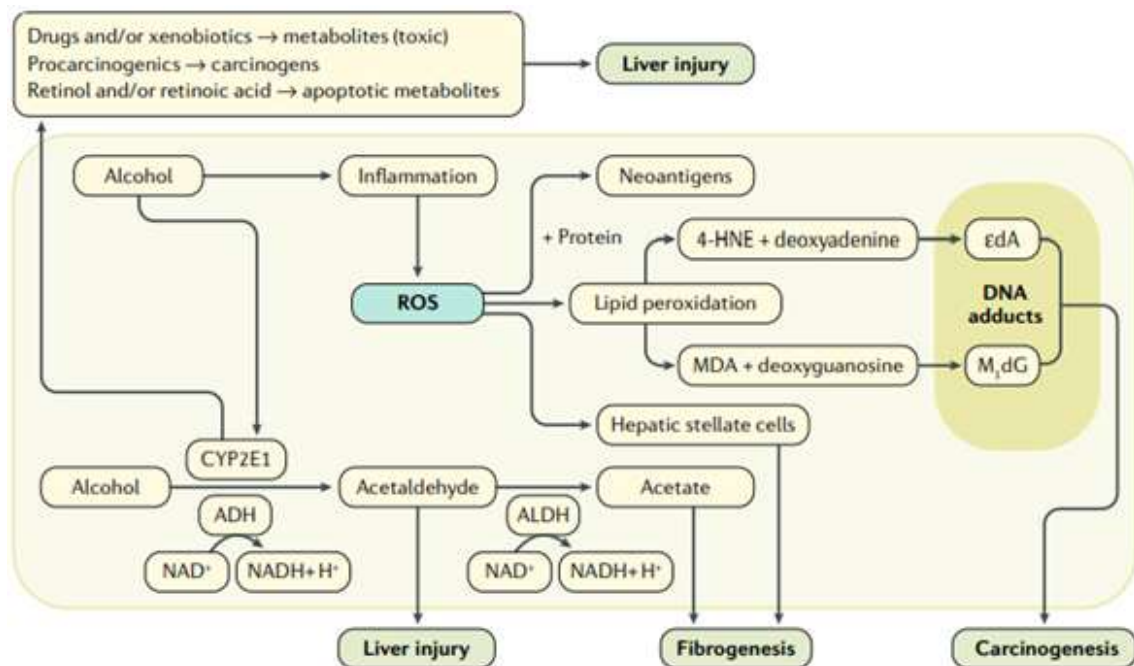


그림 16. 알코올 관련 대사 경로

[출처: Modified from Seitz et al. Nat Rev Dis Primers. 4(1):16. 2018 [50]]

알코올을 매개로 한 활성산소는 만성 알코올 소비에 의한 CYP2E1 유도 혹은 알코올성 간염과 같은 알코올 유래 염증에 의해 생성될 수 있다. CYP2E1은 높은 NADPH 산화효소 활성을 가지고 있다. 따라서 CYP2E1가 활성화되면 미토콘드리아 내 NADH의 수송이 감소되며, 이는 간세포 미토콘드리아 호흡 사슬 및 활성산소 생산의 증가를 야기한다. 알코올 유래 염증에서 TNF 생산은 N-아세틸-스핑고신과 미토콘드리아 사이의 상호작용을 촉진할 수 있으며, 이는 또한 ROS 생산을 초래한다. 또한, 아질산화 스트레스(반응성 질소종의 생성)도 알코올에 의해 증가된다.

CYP2E1은 만성적인 과음에 의해 조절되는데, 하루 40g의 알코올을 1주일 동안 섭취하였을 때 상향 조절된다. CYP2E1의 유도는 개인마다 다르며 포화지방이나 불포화지방과 같은 식사 내 지방의 질에 영향을 받는다. 또한 알코올과 철분은 시너지 효과를 발휘하여 활성산소와 산화 스트레스를 생성하고 진행성 간 손상을 강화할 수 있다. 만성 알코올 섭취는 헵시딘 농도 감소로 인해 소장의 철분 흡수 증가를 통해 간의 철분 수치를 증가시킨다.

만성 알코올 섭취는 소장 점막을 손상시켜 소화 불량, 영양소 흡수 장애, 비타민 및 미량 원소 결핍 및 체중 감소를 초래할 수 있다. 음주 후 결장 내 순수 알코올 농도는 혈중 알코올 농도와 관련이 있다. 다양한 결장 박테리아는 알코올을 대사하여 높은 농도의 아세트알데히드를 생성할 수 있으며, 이는 결장 점막 세포의 세포 손상을 초래한다.

(다) 알코올로 인한 간 내 지방축적 증가

① 관련 대사 기전

일반적으로 65세 이하의 남성은 하루 30 g, 여자는 하루 20 g(알코올 10 g은 맥주 250 cc, 소주 40 cc, 양주 25 cc 정도에 해당됨) 이상을 마시는 경우 과도한 지방축적이 나타난다. 이 양을 흔히 먹는 소주로 환산하면 남자는 일주일에 소주 3병 이상, 여자는 2병 이상에 해당된다. 알코올 과량 섭취는 간에 지방을 과량 공급하며, 지방조직에서 유리 지방산 분해를 촉진하여 간 내 유리지방산 유입을 증가시킨다는 점에서는 영양 과잉으로 인한 간 내 지방축적 과정과 공통적인 부분이 있다. 하지만, 가장 큰 차이는 간에서 알코올 산화 과정도 동시에 이루어진다는 점이다. 즉, 알코올 대사 과정에서 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)가 NADH (환원형 NAD)로 환원되는데 NADH/NAD 비율이 증가되면서 탄수화물과 지방 대사에

불균형이 나타나면서 당 신생(gluconeogenesis)은 감소되고 지방산 합성은 증가된다. 지방산 합성 증가는 지방산합성효소(fatty acid synthase, FAS), 아세틸조효소 A 카르복실라아제(acetyl CoA carboxylase, ACC), ATP 구연산염 분해효소(ATP citrate lyase, ACL), stearoyl CoA desaturase(SCD), malic enzymes(ME)와 같이 지방 합성에 관여하는 효소 발현 증가로도 알 수 있다. 이와 동시에 NADH/NAD 비율 증가로 중성지방 합성에 필요한 글리세롤 3-인산 (glycerol-3-phosphate)의 생성도 증가되므로 간 내 지방축적이 촉진될 수 있다. CYP2E1에 의해 알코올이 산화되는 과정에서 발생하는 산화 스트레스는 간세포의 환원 상태(redox state)를 변화시켜 미토콘드리아에서 이루어지는 베타-산화를 직접적으로 억제 한다. 결과적으로 지방산 산화 속도가 감소되고, 베타-산화의 기질은 계속 증가된다. 최근에는 알코올이 PPAR- α 를 통해 지방산 산화에 영향을 줄 수 있는 것으로 보고되었다. PPAR- α 는 간 내 미토콘드리아와 마이크로솜, 과산화소체에서 이루어지는 지방산 산화를 조절하는 중요한 인자인데, 알코올을 섭취하면 아세트알데히드 생성으로 PPAR- α 의 활성과 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다. 동물연구를 통해 TNF- α 도 알코올로 인한 간 내 지방축적에 관여하는 것이 확인되었다. TNF- α 수용체가 유전적으로 결여된 마우스의 경우 알코올을 섭취시키더라도 TNF- α 수용체가 있는 마우스에 비해 간 내 지방 수준이 상당히 낮았다. 본래 아디포넥틴(adiponectin)은 PPAR- α 를 매개로 하여 지방간이 생성되는 것을 억제하는 것으로 보고되고 있는데, 알코올 과량 섭취로 생성된 TNF- α 가 아디포넥틴의 작용을 억제시키는 것으로 이해되고 있다. 이 외에도, 알코올성 지방 축적에 microsomal triglyceride transfer protein(MTTP)이 관련 있을 가능성이 있다. MTTP는 중성지방과 아포지단백질 B(apolipoprotein B, apoB)를 VLDL로 만드는 데 관여하는 효소로 알코올을 섭취하게 되면 MTTP의 활성이 저하되어 간에서 합성된 중성지방이 간 조직 외로 방출되지 못하므로 간 내 지방이 축적될 수 있다. 과잉의 알코올을 섭취 시 호모시스테인을 메티오닌으로 전환시켜주는 효소 중 하나인 메티오닌 합성효소(methionine synthase, MS)의 활성이 억제되어 호모시스테인이 메티오닌으로 전환되기 어려워진다. 이에 혈중 호모시스테인 농도가 증가하는 고호모시스테인혈증(hyperhomocysteinaemia)이 유발될 수 있으며, 호모시스테인혈증은 SREBP-1c 활성화를 통해 지방 합성에 관여하는 유전자 발현을 증가시킴으로써 간 내 지방축적을 촉진하는 것으로 보고되고 있다.

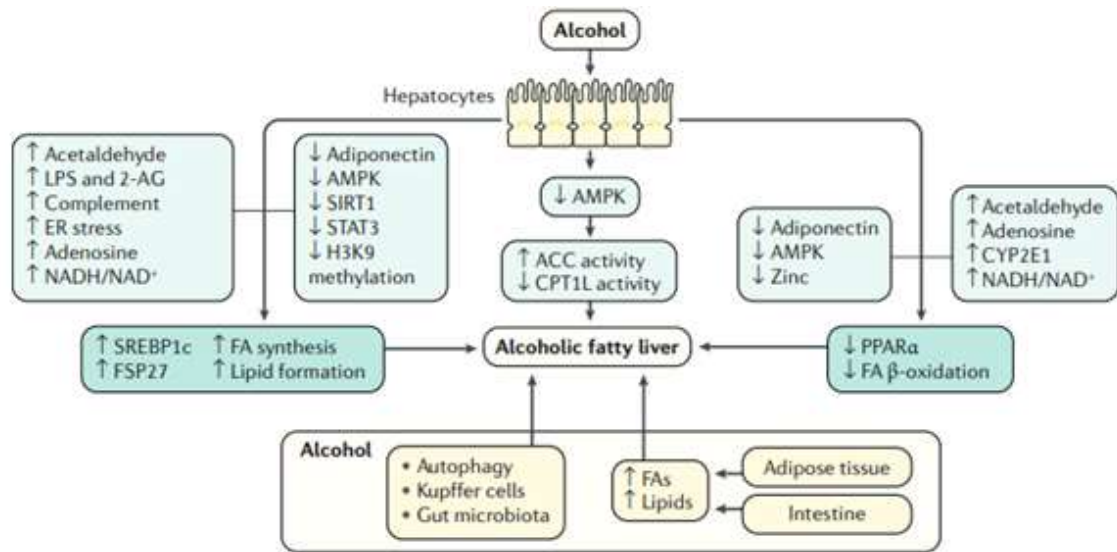


그림 17. 알코올성 지방간의 형성과 관련된 메커니즘

[출처: Modified from Seitz et al. Nat Rev Dis Primers. 4(1):16. 2018 [50]]

알코올은 스테롤 조절 요소 결합 단백질 1c(SREBP1c)와 하류 지방 생성 유전자의 상향 조절을 통해 지방산(FA) 합성을 증가시킨다. 예를 들어, 알코올은 아세트알데히드, 지질다당류(LPS), 2-아라키도노일글리세롤(2-AG), 보체, 소포체(ER) 스트레스, 아데노신 및 NADH/ NAD⁺를 증가시키거나 아디포넥틴, 5'-AMP 활성화를 억제함으로써 SREBP1c를 활성화한다. 알코올은 여러 요인의 조절을 통해 퍼옥시좀 증식인자 활성화 수용체-α(PPARα) 및 하류 β-산화 유전자의 불활성화를 통해 FA β-산화를 억제한다. 예를 들어, 알코올은 아세트알데히드, 아데노신, 시토크롬 P450 2E1(CYP2E1) 및 NADH/NAD⁺의 상승을 통해 또는 아디포넥틴, AMPK 및 아연 수준의 억제를 통해 PPARα를 억제한다. 알코올은 AMPK를 억제하고 이후 아세틸-CoA 카르복실라제(ACC) 활성을 증가시키지만 카르니틴 O-팔미토일트랜스퍼라제 1, 간 이소형(CPT1) 활성은 억제한다. 알코올은 지방 조직과 장에서 간으로 FA와 지질의 이동을 촉진한다.

(라) 알코올 대사로 인한 산화스트레스 및 염증반응 증가

알코올 대사 과정에서 생성된 상당량의 활성산소는 지질을 과산화시키는데, 지질 과산화물은 혈중 세포와 세포막을 손상시키고 결국에는 염증반응과 간섬유화를 촉진시키는 반응성 알데히드 생성을 유발한다. 또한, 활성산소 증가로 간 내 항산화 역할을 수행하는 환원형 글루타치온(reduced glutathione)이 고갈되면서 항산화능이 저하되게 된다. 글루타치온은 대부분 세포질에서 합성되거나 미토콘드리아와 마이

크로솜에도 분포하여 세포 내 대사가 원활히 이루어질 수 있는 환경을 제공한다. 따라서 환원형 글루타치온의 평형 유지는 세포 기능면에서 중요한데, 산화 스트레스로 인해 환원형 글루타치온이 고갈될 경우 이러한 세포 평형에 문제가 발생하게 된다. 또한, 알코올 대사과정에서 생성된 아세트알데히드는 반응성이 큰 물질로 단백질이나 DNA와 다양한 부가 생성물(adduct)을 형성함으로써 간 내 글루타치온을 고갈시켜 미토콘드리아에 존재하는 글루타치온을 선택적으로 감소시키며, TNF- α 생성을 촉진하는 것으로 보고되고 있다. 이로써 간세포에 독성을 유발시킨다.

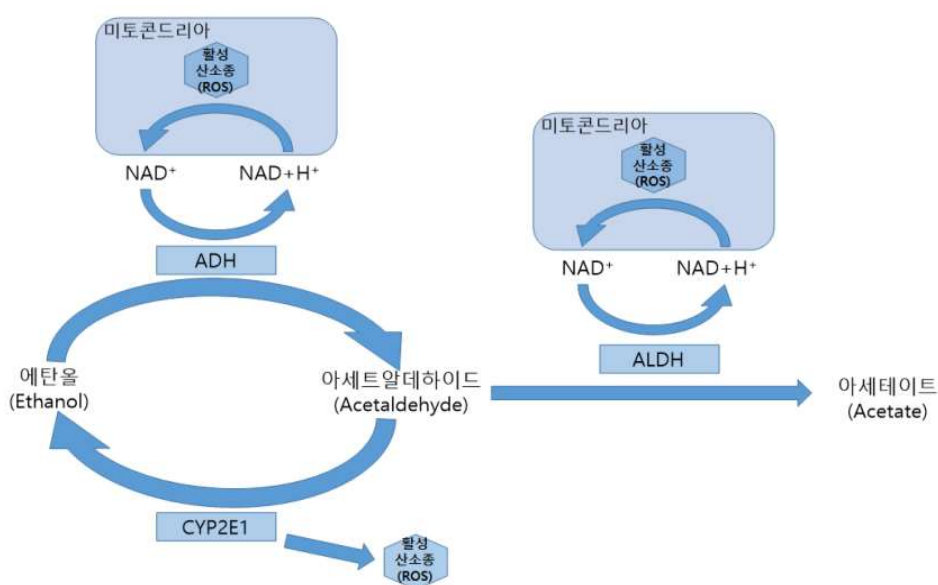


그림 18. 알코올 대사와 활성산화 생성

NAD : nicotinamide adenine dinucleotide, NADH : reduced NAD

[출처: Modified from Ramadori et al. cancers(Basel)9(10):130–151, 2017

[55]]

최근에는 과량의 알코올 섭취로 혈중 내독소(endotoxin) 수준이 증가되는 내독소혈증(endotoxemia)을 유발시킬 수 있는 기전이 제안되고 있다. 내독소의 세포벽 성분인 지질다당체(lipopolysacchride, LPS)는 쿠퍼 세포에 존재하는 TLR 4에 결합되는데, 이로써 염증성 신호물질인 NF- κ B를 활성화시키고 그 결과 사이토카인과 화학주성인자를 포함한 다양한 염증반응 관련 인자(TNF- α , TGF- β , IL-8, IL-1, IL-6, eicosanoid, PDGF)의 발현을 증가시킨다. 무균 동물이나 쿠퍼 세포가 유전적으로 결여된 동물, 또는 TLR 4에 변이가 있는 실험동물의 경우 알코올 섭취로 인한 간손상(혈중 아미노기 전이효소 증가, 염증세포의 침윤, 간세포의 지방 축적 등)이 유발되지 않는 것으로 보고되고 있다.

(3) 생체이물(xenobiotics)에 의한 스트레스

생체이물(xenobiotics)은 외부에서 인체로 유입되는 모든 외래 물질을 말하는데, 간은 장에서 유입된 유해한 생체이물을 제거하는 주요 기관이다. 알코올도 생체이물에 속하는데 이것은 분해되어 에너지로 사용될 수 있지만, 미세플라스틱과 같은 다른 생체이물들은 독성 화학물질에 속하는데 대부분은 주로 지용성이기 때문에 물에 녹을 수 없어 체외로 배설되기 어렵다. 또한, 지방조직 및 세포막과 친화성(affinity)이 높기 때문에 주로 지방조직에 수년간 축적되어 있다가 체내 상태에 따라 조직에서 분비될 수 있다. 신생물질이 간에서 대사되는 과정은 매우 복잡한 일련의 반응, 즉 phase I, phase II 반응을 거치는데, 결과적으로 지용성 독성물질은 수용성 물질로 변환되어 입자 특성에 따라 소변이나 담즙을 통해 배설된다. Phase I 과정에서는 산화(oxidation), 가수분해(hydrolysis) 등의 반응을 통해 생체이물을 좀 더 수용성으로 변화시킨다. 이 과정에서 반응성이 매우 크고 불안정한 친전자성 중간 대사 산물(reactive electrophilic intermediates)이 생성되는데, 이 물질은 DNA, 단백질과 같은 거대분자를 공격하여 손상을 줄 수 있다. 이 과정에 관여하는 중요한 효소로는 소포체에 존재하는 cytochrome P450(CYP) superfamily가 있다. 사람의 경우 5종의 CYP 유전자가 존재하는데(CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP7), 간에서 생체이물을 제거하는데 중요한 역할을 수행한다. 반면 phase II 과정에서는 포합반응(conjugation) 등의 해독 기전(detoxifying mechanism)을 통해 phase I 과정에서 생성된 중간대사산물을 수용성으로 최종 변환시켜 체외로 배설될 수 있도록 한다. 해독 작용에 관여하는 효소로는 글루타치온 S-전달효소(glutathione S-transferases, GST), uridine diphosphate-glucuronosyl transferases(UGTs), xanthine oxidase(XO) 등이 있다. 따라서 phase I과 phase II 간에 생리적인 평형을 유지하는 것이 중요하다. 만약 phase II 반응에 의한 보호 기전이 원활하지 않은 상태에서 알코올을 과량 섭취할 경우 phase I에 의해 생성된 반응성 대사산물에 의해 산화 스트레스가 증가되어 DNA 손상 등을 유발할 수 있다.

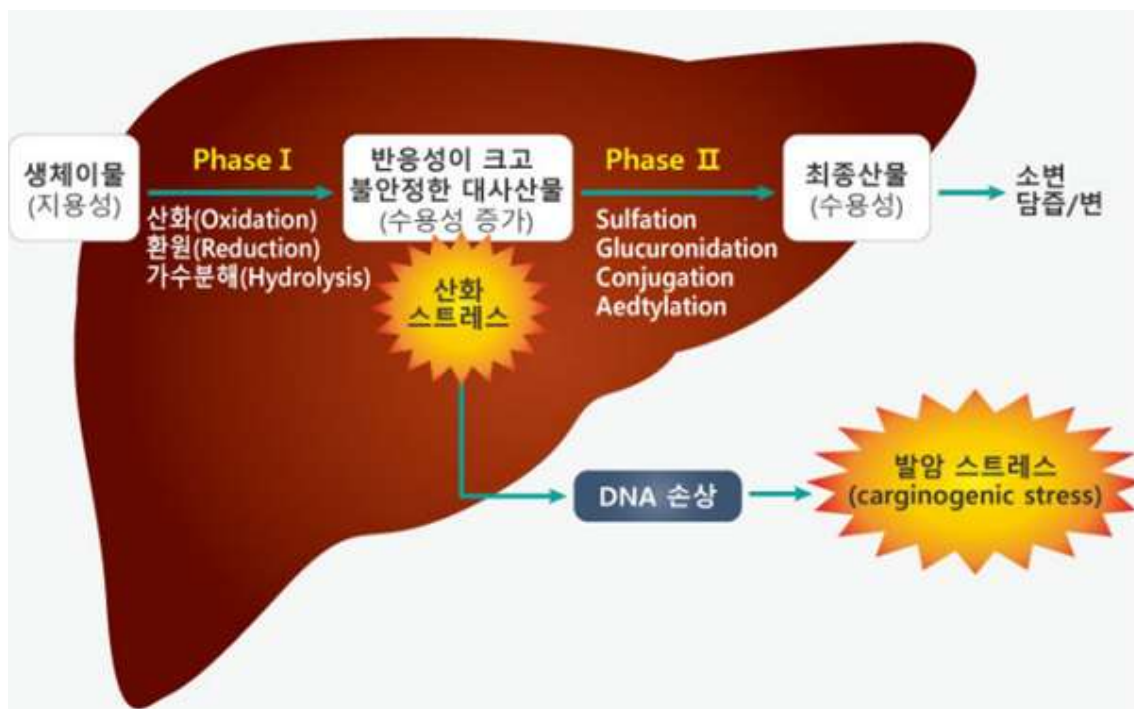


그림 20. 간 내 생체이물 제거 경로(detoxification pathway)

[출처: Altern Ther Health Med. 21(3):54-62, 2015 [78]]

독성 생체이물로부터 체내를 보호하기 위한 식이 인자를 찾고자 하는 노력이 이루어지고 있는데, 이러한 보호기능이 있는 식이 인자는 크게 2가지 종류로 나뉠 수 있다. 하나는 phase I과 phase II를 동시에 활성화시키는 양방향성 유도인자(bifunctional inducer)이고 하나는 phase II만 선택적으로 활성화시키는 단방향성 유도인자(monofunctional inducers)이다. 몇몇 식이 인자들은 phase I과 phase II 효소들의 활성을 조절하는 것으로 보고되고 있다.

2. 보건학적 중요성

간은 영양소(탄수화물, 지질, 단백질) 대사 기능, 생체이물 제거, 면역반응 등을 통한 면역 기능, 담즙분비, 혈액응고 기능 등 여러 가지 기능을 한다. 과량의 알코올 섭취, 영양과다, 대사이상, 비만 등의 원인에 의해 지방간이 발생할 수 있다. 간 내 지방축적과 염증반응 지속으로 간 기능 저하를 동반한 간경변, 간암과 같은 만성 간질환의 진행될 가능성이 높아진다.

현재 한국인에 있어 간질환은 암, 심장질환, 뇌혈관질환과 더불어 주요 사망원인의 하나이다. 우리나라에서 지방간은 지난 20년간 약 3배 이상 증가하였고, 특히 대사이상 지방간질환 발생률(metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD)이 서양과 유사한 약 30%에 이르고 있다. 우리나라의 알코올성 간질환 발생 빈도는 상대적으로 증가하며 간질환에서 차지하는 중요성 또한 증가하고 있으며 지난 25년간 간세포암종의 원인을 조사한 결과 2000년 이후에는 B형 간염바이러스 관련 예는 65%로 감소하고 non-B, non-C인 예가 25%로 상대적 증가 추세를 보여 비바이러스성으로 인한 만성간질환의 중요성이 더욱 증가될 것으로 예측되고 있다. 실제 간경변증환자의 18.6%가 알코올과 연관이 있는 것으로 보고되었다.

간 질환은 그 자체로의 사망률뿐 아니라, 제2형 당뇨병, 비만, 대사증후군 등을 통한 심혈관질환 발생 위험도가 매우 높기 때문에 간질환에 대한 조기예측 및 진단을 위한 체계적인 중재 시스템이 필요하다. 특히 간은 간세포가 서서히 파괴되어 반 이상의 기능이 저하되어도 특별한 증상이 나타나지 않기 때문에 평소에 간의 기능을 잘 유지하는 것이 중요하다.

Ⅲ. 기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구 유형별 바이오마커

간 건강 관련 기능성을 확인하기 위한 시험관시험, 동물시험 및 인체적용시험의 바이오마커는 아래의 표를 참고할 수 있다.

표 2. 대사이상으로 인해 축적된 지방으로부터 간 보호 기능성을 평가하기 위한 바이오마커

기전	바이오마커		측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	human
대사이상 관련 간의 지방 축적 지표	간 기능 관련 효소	아미노전이효소: ALT(Alanine aminotransferase), AST(Aspartate aminotransferase)	○	○	○
		GGT(gamma glutamyltransferase)	○	○	○
		ALP(alkaline phosphatase)		○	○
	간 기능 지표			○	○
	간 지방 수준	영상진단 영상진단			○
		실험적 진단	○	○	
	지방대사	혈중지질수준(중성지방, 총콜레스테롤, HDL, LDL 등)	○	○	○
		지방합성 또는 분해 관련 효소 (FAS, FASN, ACC, AMPK)	○	○	
		지방합성 또는 분해 관련 전사인자 (SREBP1c)	○	○	
		아디포넥틴	○	○	○
	염증반응		○	○	○

	인슐린저항성		혈당, 인슐린, 당화혈색소(HbA1c), uric acid, homocysteine		○	○
			HOMA-IR		○	○
	인슐린신호전달		인슐린신호전달 (pAkt, pGSK, pFoxo)	○	○	
	항산화작용		지질과산화물(MDA), 항산화효소활성(SOD, catalase, GSH 등)	○	○	○
	간세포 사멸		Apoptosis pathway	○	○	
	임상증상개선		다차원피로척도, FSS(Fatigue severity scale), CIS(Checklist individual strength), 만성피로증후군 설문 (Chalder fatigue scale)			○
	비만도	신체계 측	체중, BMI, 허리둘레, 체지방량, 복부지방량, 복부내장지방량, 사지근육량			○
	지방간 예측 점수		FLI (Fatty liver index)			○
생체이물 배설	배설능		빌리루빈		○	○
	Detoxification 관련 간내 효소		Phase I 반응효소(CYP1A1, 2 등) Phase II 반응효소(GST)		○	○

표 3. 알코올로 인한 간 기능 저하를 평가하기 위한 바이오마커

기전	바이오마커		측정 가능한 연구 유형				
			in vitro	in vivo	human		
알코올 관련 간 지표	간 기능 관련 효소		아미노전이효소: ALT(Alanine aminotransferase), AST(Aspartate aminotransferase)		○	○	○
			GGT(gamma glutamyltransferase)		○	○	○
			ALP(alkialine phosphatase)			○	○
	간 지방 수준	영상진단	간초음파, CT, MRI, MRS, 간섬유화 검사(순간탄성측정법)				○
		실험적 진단	지방구 염색법, 중성지방정량, H&E 염색법		○	○	
	지방 대사	지방산 산화	PPAR-a, AMPK, CD36, NAD+/NADH		○	○	
		지방산 합성	SREBP1c, FAS, FASN, ACC		○	○	
		지단백 분비	VLDL (중성지방)		○	○	○
		에너지 상태	NAD+/NADH ratio		○	○	
	염증반응		사이토카인(IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-37, TNF-α 등), NK-kB, TGF-β1, CD14, CD571		○	○	○
	항산화작용		지질과산화물(MDA), 항산화효소 활성(SOD, catalase, GSH 등)		○	○	○
	간세포 사멸		Apoptosis pathway		○	○	
	임상증상개선		다차원피로척도, FSS(Fatigue severity scale), CIS(Checklist individual strength), 만성피로 증후군 설문(Chalder fatigue scale)				○
	비만도	신체계측	체중, BMI, 허리둘레, 체지방량, 복부지방량, 복부내장지방량, 사지근육량				○

알코올 대사	알코올 대사	혈중 알코올농도, 제거속도, 혈중 알데히드 수준 변화, 제거속도		○	○
	알코올 대사 관련 효소	CYP2E1, ADH, ALDH		○	
생체이물 배설	배설능	빌리루빈		○	○
	Detoxification 관련 간내 효소	Phase I 반응효소(CYP1A1, 2 등) Phase II 반응효소(GST)		○	○

나. 바이오마커 설명

(가) 간 기능 관련 효소

① 아미노전이효소(transaminase)

아미노전이효소는 간세포성 질환이나 간염과 같은 간 질환의 유무를 추측할 수 있는 중요한 수치이다. 알라닌 아미노전이효소(Alanine aminotransferase; ALT, 과거에는 GPT로 불림)와 아스파르트산 아미노전이효소(Aspartate aminotransferase; AST, 과거에는 GOT로 불림)는 전신의 세포에 분포하는데 ALT가 주로 간세포의 세포질에 존재하는 데 반해, AST는 심장, 간, 횡문근, 신장, 적혈구의 세포질과 미토콘드리아에 분포한다. ALT와 AST는 간 내에 각각 혈청의 7,000 및 3,000배 많이 존재하며 간 손상 시 혈청 내로 흘러나온다. 따라서 간세포가 파괴되면 혈중 농도가 증가하게 되므로 간세포 괴사의 표지자로 이용된다. 특히 AST의 경우 심장, 근육, 신장 세포 등에도 존재하지만, ALT는 간에만 존재하는, 간세포 특이적 효소이기 때문에 ALT의 상승은 간세포 독성을 직접적으로 반영한다. 그러나 이들 효소의 혈중수준은 변화의 기복이 심하기 때문에 한 시점에서 수준이 증가되었다는 것만으로는 대사이상관련 간의 지방 축적 여부를 단정 지을 수는 없다. 혈액에서 간편하게 측정 가능하며, 간 손상 가능성을 제시해 주므로 널리 측정되고 있다[79].

② GGT (γ -glutamyl transferase)

γ -GTP (γ -glutamyl transpeptidase)라 불리기도 하며, 임상적 의의가 있다. 간 외에도 신장, 비장, 췌장, 심장 및 뇌 등 여러 기관에 존재하지만 혈청 GGT의 대부분은 간과 담관 상피세포에서 유래한다. 알코올에 의해 유도되기 쉬워 알코올 과다 섭취 시 많이 증가하는 것으로 알려져 있다. 다수의 비만한 사람들을 대상으로 장기 추적 관찰한 코호트 연구들에 의하면, 지방간이 있는 경우 GGT가 내부 장기 지방의 지표이며, GGT가 높은 경우 제2형 당뇨 발생의 위험 인자로 작용할 수 있어 내부 장기 지방, 지방간, 인슐린저항성의 지표로 이용될 수 있음이 제시되었다.

③ 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP)

ALP는 간, 뼈, 백혈구, 장, 태반 등에 분포하는데, 혈청 내 존재하는 ALP는 대부분 간과 뼈에서 유래된 것이다. 간담도계에 문제가 있는 경우 ALP 상승이 동반되기도 하는데, 일반적으로 담즙정체나 담도가 폐쇄된 경우 효소 생산이 증가되어 나

타난다. 혈청 ALP가 증가되었다고 해서 간 건강에 문제가 있다고 볼 수는 없기 때문에 다른 마커들과 함께 측정하는 경우가 대부분이다. 만약 ALP가 의미 있게 증가되었다면 우선 간에 문제가 있는 것인지 간 이외의 다른 기관에 문제가 있는지 확인이 필요하다[80].

(나) 간기능 지표

① 총 담즙산(Total bile acids, TBA)

간세포성 또는 간담즙성 손상지표이다. 담즙산은 콜레스테롤 분해 산물로서 간에서 합성 되어 담낭에서 저장되며, 소장으로 분비되어 콜레스테롤과 같은 지질을 유화시켜 체내 흡수 될 수 있도록 도와준다. 간문맥으로 재흡수되고, 담즙으로 재분비되는 대사과정을 거친다. 공복상태 또는 식후 환자의 비정상적인 수치는 간기능 이상을 의미할 수 있다.

(다) 간의 지방 수준

① 영상진단

영상진단은 임상적 활용가치가 큰 지표이다.

■ 간초음파(liver ultrasonography)

간초음파는 다른 검사법에 비해 안전하고 방사선 노출이 없는 방법으로 지방간이 있는 사람들을 선별하기 위해 가장 널리 이용된다. 하지만, 검사가 주관적이며 간 내 지방이 30% 미만인 경우에는 진단의 민감도가 70 % 미만으로 낮고, 간 내 지방함량을 정확히 정량하기 어렵다는 한계가 있다.

■ 컴퓨터단층촬영(computed tomography, CT)

CT는 간 내 지방함량을 정량하는데 좋은 방법으로 정확도(accuracy)가 높은 편이다. 하지만 지방간 수준 감별을 위한 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)는 낮은 편이다. 또한, 방사선에 노출된다는 한계를 가지고 있다. 중등도에서 중증의 지방증을 감지하고 정량화할 수 있으나, 경미한 지방증을 진단하는 데는 부정확할 수 있다.

■ 자기공명영상촬영(magnetic resonance imaging, MRI)

MRI는 자기장과 비전리 방사선인 라디오 고주파를 이용하므로 인체에 해가 없고, CT에 비해 정확도가 더 높다. 보통 초음파나 CT에서 진단이 미진하여 추가적으로 시행하거나 CT 조영제의 부작용이 있는 환자들에게 흔히 사용한다.

■ 자기공명분광(magnetic resonance spectroscopy, MRS)

간 내 중성지방 함량을 매우 정확하게 측정할 수 있지만, 특수 고가 장비가 필요하여 인체연구에서 사용이 매우 제한적이다.

■ 간섬유화 검사(순간탄성측정법)

순간탄성측정법은 간경직도를 측정하여 간섬유화를 평가하는 비침습적인 방법으로 최근 임상적으로 널리 사용되고 있으며, 함께 측정되는 controlled attenuation parameter(CAP)은 지방 침착의 정도를 정확히 평가하는데 유용하다.

② 실험실적 방법

세포 및 동물실험을 통한 기전연구 바이오마커로 활용될 수 있다.

■ 지방구 염색법(Oil-red O staining)

Oil Red O는 지질 용해성이 큰 diazo계 염색 물질로서 중성지방이나 파라핀 절편의 지단 백질을 염색하는데 사용된다. 세포 모델에서 HepG2 세포를 CCl₄ 또는 에탄올로 지방구를 유도한 후 지방구 염색법으로 중성지방 함량을 측정하기도 한다.

■ 세포 또는 조직 내 중성지방 정량

Folch 법 등을 이용하여 간세포 또는 간조직을 클로로포름 또는 메탄올을 사용하여 지질을 추출하여 중성지방 함량을 분석하는 방법이다.

■ H&E (hematoxylin & eosin)염색법

검푸른 색을 내는 헤마톡실린(hematoxylin)과 붉은 색을 내는 에오진(eosin)의 두 염료를 이용하는 염색법으로 세포핵은 검푸르게 염색되며 대부분의 세포질 성분은 분홍색 또는 붉은 색으로 염색된다. 이 염색법을 이용하여 세포의 핵과 세포질을 관찰할 수 있다. H&E 염색한 조직을 광학현미경으로 관찰 시 지방변성, 괴사, 섬유화 현상 및 간 조직의 재생 등을 각 실험군 별로 비교 검토할 수 있다.

(라) 지방대사

① 혈중지질수준

간은 지단백질의 합성 및 대사가 일어나는 중요 장기이다. 따라서 간 건강에 문제가 있을 경우 지단백질 수준 이상이 나타날 수 있다. 대사이상으로 간에 지방이 축적된 경우, 혈중 HDL-콜레스테롤이 감소하고 중성지방과 총콜레스테롤 수준이 증가되는 것으로 보고되고 있다. 총 콜레스테롤 수준이 증가 되는 기전은 아직 명확히는 않지만, 일부 연구자들에 의해 간에서 만들어지는 효소인 lecithin cholesterol acyltransferase(LCAT)의 생성 부족으로 유리 콜레스테롤 (free cholesterol)이 증가되는 것으로 제안되고 있다. 간세포 손상으로 혈중 중성지방이 증가되는 것은 지단백 지질분해효소(lipoprotein lipase)가 간에서 잘 생성되지 못하기 때문일 수 있다. 특히 대사이상으로 간에 지방이 축적된 경우, 인슐린 저항성, 비만, 혈당조절 장애 등이 동반되어 있는 경우가 많기 때문에 혈중 지질수준 개선 여부를 함께 확인하는 것이 일반적이다. 보통 총콜레스테롤(total cholesterol), HDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 함량을 직접 측정하기도 하고, LDL/HDL-콜레스테롤 비율, HDL/총콜레스테롤 비율 등을 계산하여 변화수준을 확인하기도 한다. 또한 말초 지방조직에서의 지방분해 수준을 확인하기 위해 혈중 유리지방산(free fatty acids) 수준을 함께 측정할 수 있다.

② 지방 합성 또는 분해 관련 효소

■ 지방 합성에 관여하는 효소

지방산합성효소(fatty acid synthase, FAS), 아세틸조효소A 카르복실라아제(acetyl CoA carboxylase, ACC), stearoyl CoA desaturase(SCD), glycerol-3 phosphate acyltransferase(GPAT) 등 지방 합성에 관여하는 효소의 발현 수준을 측정할 수 있다.

■ 지방산 산화, 말초 지방조직에서의 지방 분해에 관여하는 효소

미토콘드리아에서 일어나는 지방산 산화 과정에서 중요한 역할을 하는 carnitine palmitoyl transferase(CPT), 지방산 전위효소(fatty acid translocase, FAT) 발현 수준을 측정할 수 있다. 또한, 인슐린 저항성이 있는 경우 호르몬 감수성 지방질 가수분해효소(hormone sensitive lipase, HSL)의 활성이 증가되므로 지방조직 내 발현 수준을 측정하는 것도 의미 있다.

■ Adenosine monophosphate-activated protein kinase(AMPK)

AMPK는 세포 내 에너지가 결핍될 때 활성화되어 세포 내 에너지 생산을 증가시키는 효소이다. AMPK가 활성화되면 지방 합성에 관여하는 효소의 활성은 억제되고, 지방산 산화에 관여하는 효소의 활성은 증가된다. 시험관 연구에서는 HepG2 세포에서 AMPK의 유전자나 단백질 발현 수준을 측정할 수 있고, 동물에서도 간 및 지방조직에서 측정 가능하지만 사람의 경우 조직을 생검하는데 한계가 있어 널리 측정되지는 못한다. 다만, 최근 일부 연구들에서는 복부 피하지방을 생검하여 AMPK 활성 변화와 지방 합성 또는 분해 관련된 효소들의 유전자 발현을 확인하기도 한다.

③ 지방 합성 또는 분해 관련 전사인자

지방 합성 및 분해는 다양한 전사인자에 의해 조절될 수 있다. SREBP-1c는 지방 대사를 조절하는 전사인자로서 지방산 및 중성지방 합성을 유도시킴으로써 간 내 지방 축적을 촉진 하는 것으로 알려져 있다. CCAAT-enhancer-binding proteins(C/EBP) α 는 백색지방 조직과 갈색지방조직에서 발현되는 전사인자로 C/EBP β 와 C/EBP δ 는 지방세포 분화과정의 초기단계에 발현이 증가되어 PPAR- γ 의 발현을 유도하며 PPAR- γ 의 발현 증가는 C/EBP α 의 지방세포 분화 후기의 발현을 유도하며 지방세포 증식과 인슐린 민감도 향진에 관여한다. PPAR- α 는 간에서 발현되며, 중성지방의 순환을 감소시키고, HDL-콜레스테롤을 증가시킨다. ChREBP는 지방합성을 촉진한다. 효소와 마찬가지로 위의 전사인자는 세포 및 동물 모델에서 측정 가능하지만, 인체 연구에서는 생검이 필요하기 때문에 복부 피하지방을 생검하여 일부 전사인자의 유전자 발현을 확인하기도 한다.

④ 인슐린신호전달 (pAkt, pGSK, pFoxO)

인슐린은 포도당 및 지질 대사와 같은 중요한 에너지 기능을 제어하는 주요 호르몬이다. 인슐린은 인슐린 수용체 티로신키나제(IR)를 활성화하여 IRS 단백질 계열과 같은 다양한 기질 어댑터를 인산화시키고 수집한다. 티로신이 인산화된 IRS는 수많은 신호 전달 대상에 결합 부위를 표시한다. 그 중 PI3K는 주로 Akt/PKB를 활성화하여 인슐린 기능에서 중요한 역할을 한다. 활성화된 Akt는 GSK-3 억제를 통해 글리코겐 합성을 유도하고, mTOR 및 하위 요소를 통해 단백질 합성을 유도하고, 여러 가지 친세포사멸제(Bad, FoxO 전사 인자, GSK-3 및 MST1) 억제를 통해 세포 생존을 유도한다. Akt는 FoxO 전사 인자를 인산화하고 억제하여 대사와

자가포식작용을 조절하는데 반해, AMPK는 FoxO3를 조절하고 전사 활동을 활성화하는 것으로 알려져 있다. 인슐린 신호 전달 경로는 Akt와 mTORC1에 의해 억제되고 AMPK에 의해 활성화되는 ULK1 키나제를 통해 자가포식을 억제한다. 인슐린은 GLUT4 소포를 세포막으로 전위시켜 근육과 지방세포에서 포도당 흡수를 자극한다. GLUT4 전위에는 PI3K/Akt 경로와 IR 매개 CAP 인산화, CAP:CBL:CRKII 복합체 형성이 포함된다. 또한 인슐린 신호 전달은 CREB/CBP/mTORC2 결합을 방해하여 간에서 포도당신생합성을 억제하는 역할을 한다.

⑤ 아디포넥틴

아디포넥틴은 체내 지방수준과 반비례관계가 있으며, 인슐린 민감성을 향상시킨다.

(마) 지방산 산화와 합성

간에서 SREBP1c는 콜레스테롤 합성에 관여하고 PPAR- α 는 지방산 분해에 관여한다. 간에서 지방산의 합성과 분해에 관여하는 하므로 mRNA 발현을 real time PCR로 측정한다, 특히 알코올성지방간에서는 간에 NAD⁺/NADH 비율에 의해서 지방산 생합성이 영향을 받으므로 이 비율을 측정하는 것이 중요하다.

(바) 지단백 분비

① VLDL 지질 수준

VLDL 함량은 간에서 분비하는 중성지방의 함량을 측정할 수 있으나 공복의 VLDL함량은 다른 조직으로 유입된 것을 빠진 것이므로 직접적으로 알 수 없는 단점은 있지만 알코올성 지방간 환자에서는 조직으로 유입되는 중성지방의 함량의 차이가 크지 않을 것으로 사료되어 혈중 VLDL 함량으로 간에서의 분비 VLDL 함량을 예측할 수 있다.

(사) 에너지 상태

① NAD⁺/NADH ratio

니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드의 산화 및 환원 형태 균형을 NAD⁺/NADH 비율이라고 한다. NAD⁺는 NADH로 전환될 수 있으며 그 반대도 가능하고 이러한 전환은 세포 에너지를 생성한다. NAD⁺와 NADH의 비율은 효과적으로 ATP를 생산할 수 있는지를 나타내는 수치이기도 하다. 건강한 상태의 경우 세포질의 NAD⁺/NADH 비율은 약 700:1로, 해당 비율은 산화 반응에 유리하고 [44, 45], 나이가 들면서 NAD⁺와 NADH의 비율은 감소한다.

(아) 염증반응

① 사이토카인(cytokines)

간 내 지방축적은 간 염증을 유발하며 간 염증은 간 섬유증을 유발하는 중요한 증상이다. 인터류킨-6(IL-6), 종양괴사인자- α (TNF- α) 같은 염증성 사이토카인과 MCP-1, CCL2 같은 대식세포유인 단백질 및 혈관세포 부착분자 VCAM-1 같은 케모카인의 영향을 받는다. 혈청과 조직에서 측정할 수 있다.

② Fragmented CK-18

염증 지표 중 fragmented CK-18은 대사이상 지방간염 진단에 보조적 도움을 받을 수 있는 인자이다.

(자) 항산화작용

① 지질과산화물

간 조직 내 다중불포화지방산이 활성산소에 의해 산화되어 생성되는 4-hydroxyl-2, 2-nonenal(HNE), 4-hydroxyl-2,3-alkenals(HAKs), malondialdehyde(MDA)와 같은 지질과산화물을 널리 측정한다. 세포모델에서 HepG2 세포에서 측정 가능하며, 동물모델에서는 간조직, 혈장, 적혈구 등에서 측정할 수 있다. 사람의 경우 혈장과 적혈구에서 측정하는 것이 일반적이다

② 항산화효소

항산화 효소 중 과산화물 제거효소(superoxide dismutase, SOD), 카탈라아제(catalase, CAT), glutathione peroxidase(GPx) 등의 활성을 혈장이나 적혈구에서 측정하는 경우가 많다. 동물연구에서는 간조직에서 항산화 효소의 단백질 발현과 활성을 함께 측정할 수 있다.

③ 비효소적 항산화 체계

비효소적 항산화 체계 중 환원형 글루타치온(reduced glutathione) 수준을 널리 측정한다. 글루타치온은 간에서 만들어지는 3개의 아미노산(glutamate, cysteine, glycine)이 결합된 펩타이드로 산화적 손상으로부터의 보호에 중추적인 역할을 하는 매우 강력한 항산화 물질이다. 특히 간, 효모, 근육 등에 많이 함유하며 인체의 간에서 산화-환원 항상성을 유지하는 중요한 완충작용을 하고 있다. 즉, 간에서 산화스트레스가 유발될 경우 환원형 글루타치온이 산화 작용을 막기 위해서 전자를 제공함으로써 산화 스트레스를 제거해준다. 글루타치온은 GPx가 관여하는 항산화

대사 작용을 위해 필요한 전자를 내어주며, 반응성이 큰 자유 라디칼(free radicals)을 제거하는 역할을 하며, 지질 과산화(lipid peroxidation)의 환원에도 관여한다. 세포 모델에서는 주로 HepG2 세포 내 함량을 측정하기도 하고, 동물 모델에서는 간조직 내 함량 또는 혈중 수준을 측정하기도 한다. 인체에서는 조직 내 함량 측정이 어렵기 때문에 혈중 수준을 측정하는 것이 일반적이다. 환원형 글루타치온과 산화형 글루타치온을 함께 측정하여 총 글루타치온 함량 뿐만 아니라 환원형:산화형 비율을 구하기도 한다.

(차) 간세포 사멸

간세포 사멸은 대표적인 기전 연구 바이오마커로 활용될 수 있다.

① Apoptosis pathway

■ Caspase

Caspase는 단백질 분해효소의 일종으로 세포사멸에 필수적인 역할을 한다. Caspase는 initiator caspase(-2, -8, -9, -10)와 effector caspase(-3, -6, -7)로 2종류로 나뉘며, initiator caspase는 대체적으로 세포사멸 신호에 의해 우선적으로 활성화되며, 이후 effector caspase로 신호가 전달된다. 따라서 신경세포사멸을 확인하기 위하여 caspase 활성화, caspase/ cleaved caspase 단백질 발현 정도를 측정한다.

■ Bcl-2, Bax, MAPK(p-JNK, p-ERK, p-p38 protein) 등

Bax(bcl-2-associated X protein)은 구조적인 변화를 거쳐 세포사멸을 유도하는데, 이로 인해 미토콘드리아에서 사이토크롬 C(cytochrome c)와 세포사멸인자가 나오게 된다. Bcl-2 family는 세포사멸의 주요 경로를 제어하는 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아의 외막 등에 제한적으로 분포되어 있으며, 미토콘드리아의 기능 조절을 통해 세포사멸을 제어한다. 따라서 Bax/Bcl-2 비율이 높아지게 되면 세포사멸이 증가하게 되는데, Bax/Bcl-2 비율을 측정함으로써 기능성 소재를 통한 세포사멸 억제 효과를 관찰할 수 있다.

(2) 대사이상 관련 요인

(가) 임상증상 개선

간 건강 개선을 평가한 대수의 연구들에서 피로도 변화 여부를 설문을 통해 확인하기도 한다. 현재까지 간 건강과 피로와의 직접적인 상관관계는 밝혀진바 없으며, 특히 고혈압, 당뇨 등 다른 건강문제에서도 피로증상이 수반되는 것으로 보고되고 있으므로 간 건강 개선 지표로 피로도를 단독 측정하는 것은 바람직하지 않다. 다만 혈액 생화학적 바이오마커와 병용하여 사용할 경우 연구 대상자의 삶의 질 개선에 대한 보조적인 평가 지표로는 활용될 수 있다. 임상 연구에서 일반적으로 사용되는 설문 도구로는 다차원피로척도(multi-dimensional fatigue inventory), FSS(Fatigue severity scale) 설문지, CIS(Checklist individual strength) 설문지, 만성피로증후군 설문(Chalder fatigue scale, CFS)이 있으며 피로로 인한 신체적, 정신적 상태를 평가한다.

(나) 비만도

대사이상 지방간질환(MASLD) 환자의 90%가 적어도 한 가지의 대사증후군 특징을 가지며, 33%에서는 대사증후군의 모든 특징을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 대사증후군 환자에서 연령, 성별 체질량지수에 상관없이 간조직 지질 함량이 증가하며 당뇨병, 비만, 지질 이상, 고혈압과 같은 여러 가지 대사 이상은 대사이상 지방간질환(MASLD)과 연계가 되어 있다. 이러한 비만 인구에서, 대사이상 지방간질환(MASLD)의 유병률이 정상 체질량지수(BMI)인 사람에 비해 5배가 증가한다. 이러한 이유로 대사이상 지방간질환(MASLD) 개선 여부를 평가할 때 비만도 개선을 조사하는 것이 필요하겠다.

(다) 인슐린저항성

① 혈중 포도당, 인슐린, 글루카곤(glucagon), C-펩타이드(C-peptide), 당화혈색소(HbA1c), 요산(Uric acid), 호모시스테인(Homocysteine)

대사이상으로 간에 지방 축적이 발생한 경우 인슐린 저항성과 밀접한 관련성이 있으므로 대사이상으로 인한 간에 지방 축적 개선여부를 확인하기 위해 인슐린 저항성과 함께 포도당 대사와 관련된 혈중 지표를 측정하는 것이 일반적이다. 이를 위해 혈중 포도당 농도, 인슐린, 글루카곤 수준을 함께 측정한다. 또한 췌장 β -세포에서 인슐린과 함께 동량으로 생성되는 C-펩타이드를 측정함으로써 인슐린 분비 수준을 가늠하기도 한다.

당화혈색소는 혈당의 평균치를 평가하는 것으로 당화된 A1c형 혈색소의 농도를 측정하여 검사할 수 있고, 혈중 포도당 수치가 높을 수록 더 많은 당화혈색소가 생성된다. 당화혈색소 검사는 주로 당뇨를 진단받은 사람에서 혈당이 조절 수준을 가늠하는데 사용되지만, 당뇨병 외에 MASLD와도 높은 관련성을 가지고 있다[89, 90].

요산 수치의 증가는 인슐린 저항성의 증가를 의미하는데, 이는 혈중 인슐린이 증가하면 신장에서 재흡수되는 요산의 양이 증가하기 때문이다. 요산 수치가 올라가면 산화질소 생산량이 감소하고, 산화질소의 감소로 인슐린의 포도당 저장 기능을 제대로 하지 못해 인슐린 저항성이 커지게 된다. 요산 수치는 MASLD와 양의 상관관계를 가지고 있다[91].

호모시스테인(Homocysteine)은 MASLD와 높은 관련성을 가지며[92], 호모시스테인의 수치가 증가하면 인슐린 효과가 차단되고 포도당 흡수를 방해한다. 연구에 따르면 인슐린 수용체 베타 서브유닛(IR-β), AKT2 및 AS160의 인산화 수치가 감소하고 HepG2 및 HL-1 세포에서 IR 알파(IR-α) 및 베타(IR-β) 서브유닛의 단백질 수치가 감소하여 나타났다. 호모시스테인의 수준이 증가하면 IR-α와 IR-β 풍부도의 감소가 인슐린 저항성을 야기할 수 있다[93].

② 인슐린 저항성 또는 민감성 지수

HOMA-IR(homeostatic model assessment of insulin resistance)은 인슐린 저항성을 측정하는 방법으로 공복혈당과 인슐린 수치 등을 이용하여 산출한다.

$$\text{HOMA-IR} = (\text{공복인슐린수치}(\text{microU/L}) \times \text{공복혈당}(\text{mmol/L})) / 22.5$$

(라) 지방간 예측 점수

① FLI (Fatty Liver Index)

과거 MAFLD 진단을 위해서는 간생검을 필요로 하였으나[94], 간생검은 사망률을 0.009%에서 0.14%로 증가시킬 수 있는 고통과 복강 내 출혈 위험을 동반하고, 전체 간에 비해 일부의 부위를 반영한다는 단점이 있다[95]. 이러한 단점을 보완하기 위해 새로운 비침습적 검사의 필요성이 대두되었다[96, 97]. 그 방법은 여러 비침습적 혈청학적 바이오마커를 그룹화하여 간질환을 예측 및 진단하는 것이다[98]. 현재까지 MAFLD/NAFLD의 정확한 검출을 위해 단일 마커가 사용되지 않았는데, 임상적 특징과 서로 결합하면 질병에 대한 정확한 진단, 병기 및 예후에 도움을 줄 수 있다[99].

(3) 알코올대사 및 관련 효소

(가) 알코올 대사

알코올 대사는 혈중 알코올 농도 또는 혈중 알코올 제거 속도, 알데히드 수준의 변화 등으로 파악할 수 있다.

(나) 알코올 대사 관련 효소

① Cytochrome P450 2E1(CYP2E1)

알코올이 대사되는 두 번째 경로는 마이크로솜(microsome)에 존재하는 알코올 산화 시스템 (microsomal ethanol-oxidizing system, MEOS)인데, 알코올을 과량 섭취했을 때에 가동된다. 주로 CYP2E1이 관여하는데, 알코올을 만성적으로 섭취하는 경우에도 활성이 증가될 수 있다.

② 알코올탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)

ADH는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 알코올에서 알데히드로의 산화를 촉매 하는 효소이다. ADH는 여러 종류의 동종효소(isoenzyme)가 있는데, 에탄올을 기질로 사용하여 활성을 측정할 경우, 이 효소의 생체 내 분포는 95%가 간이고, 타 장기는 위점막, 신장, 고환, 뇌, 망막 등에서 약간의 활성이 나타날 뿐이고 간세포 내에서는 세포질에 존재한다. 또한, 간의 소엽 내 분포는 중심정맥주위의 소엽 중심부에 국한하여 존재하는 것이 밝혀졌다. 따라서 ALT나 LDH 등과 마찬가지로 간의 유출효소로서의 성격이 있으므로 혈청에서 이 효소 활성을 측정하는 일은 간세포의 장애 정도, 특히 간소엽 중심부의 간세포 장애를 파악하는데 유용한 검사이다.

③ 알데히드탈수소효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)

체내에 들어온 알코올의 대부분(80-90 %)은 간세포의 ADH효소에 의해 아세트알데하이드로 신속히 분해된 후 ALDH효소에 의해 산화·분해되는 과정을 거친다. 아세트산이 형성된 후 이산화탄소와 물로 가수분해되어 완전한 분해과정을 거치게 된다.

(4) 생체 이물 관련 요인

(가) 배설능

① 빌리루빈(bilirubin)

빌리루빈은 건강한 성인에서 하루 약 250–350 mg 생성되며, 이중 약 85%가 수명을 다한 적혈구가 파괴되면서 생성되는 대사산물로 담즙산과는 달리 생리적인 기능이 없다. 적혈구 파괴로 생성되는 빌리루빈은 비수용성인 간접 빌리루빈(indirect bilirubin 또는 unconjugated bilirubin)으로 본래 간세포로 유입되어 포합과정(conjugation reaction)을 거친 후 수용성의 직접 빌리루빈(direct bilirubin 또는 conjugated bilirubin)으로 변환되어 담관으로 배설된다. 간세포 손상이 있거나 담관에 문제가 있는 경우 혈청 내 직접 빌리루빈이 증가된다. 적혈구 파괴가 증가되어 간접 빌리루빈 자체의 생성량이 증가되거나, 생성된 간접 빌리루빈이 간으로 이동되는 데 문제가 있거나, 간에서 포합과정이 원활하지 않을 때는 혈청 내 간접 빌리루빈 수준이 증가될 수 있다. 총 빌리루빈 수준은 대사이상관련 간의 지방 축적 확인을 위한 민감한 지표가 아니지만 다른 지표들과 함께 측정함으로써 종합적인 결과 해석에 도움이 될 수 있다

(나) 생체 이물 관련 간 효소

① Phase I 반응 효소

■ 사이토크롬 P450 1A2(cytochrome P450 1A2, CYP1A2)

CYP450은 heme에 포함되어 있는 철 이온이 환원상태에서 일산화탄소와 결합 시 특이적인 흡광 스펙트럼을 보임으로써 그 이름이 유래되었다. 주로 생체이물의 산화적 대사(oxidative metabolism)에 관여함으로써 이들 물질이 소변이나 담즙으로 쉽게 배설될 수 있도록 친수성 물질로 전환시킨다. CYP450은 다양한 subtype을 가지고 있는데 그 중 MROD(methoxyresorufin O-dealkylase)는 CYP1A2 type의 subfamily를 가진다.

■ N-아세틸기 전달효소(N-acetyl transferase, NAT), xanthine oxidase(XO)

NAT는 발암성 물질을 포함하여 다양한 생체 이물에 존재하는 방향족 아민화합물(aromatic amines)을 아세틸화(acetylation)시키는 효소이다. XO는 체내 퓨린계(purines) 또는 피리 미딘계(pyrimidines) 물질대사에 관여하는데 작용 고정에서 활성산소가 생성된다.

② Phase II 반응 효소

대표적인 phase II 반응 효소로서, 글루타치온 S-전달효소(Glutathione-S transferase, GST)는 조직마다 분포하는 종류가 다르다. 세포질에 존재하는 GST는 4가지 종류가 있다 (α , μ , π , θ 타입). 간에는 GST- α 와 GST- μ 가 주로 존재하는

데, GST-α가 75% 이상을 차지하므로 GST-α가 간에서 생체이물을 해독 (detoxification)하는데 중요한 역할을 한다. 혈청에서 쉽게 측정 가능하며, 타액 내 수준이 조직 수준을 반영하는 것으로 보고되고 있어 타액에서도 측정하는 경우가 많다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

(1) 대사이상으로 인한 간 내 지방 축적 관련 요인

(가) 간기능 관련 효소

① 아미노전이효소(transaminase)

혈액에서 간편하게 측정 가능하며, 간 손상 가능성을 제시해주므로 널리 측정되고 있다. 혈액을 11,950 g에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 회수하고 화학분석기, assay kit 또는 bromocresol green method를 사용하여 측정한다.

② GGT (γ -glutamyl transferase)

γ -GTP(γ -glutamyl transpeptidase) 측정은 혈액을 11,950 g에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 회수하고 화학분석기, assay kit 또는 Persijn and van der Slik method를 통하여 측정한다.

③ 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, ALP)

ALP는 혈액을 11,950 g에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 회수하고 화학분석기, assay kit 또는 bromocresol green method를 사용하여 측정한다.

(나) 간기능 지표

① 총담즙산(Total bile acids, TBA)

혈청에서 담즙산의 농도를 gas chromatography-mass spectrometry (GCMS)로 결정하고 담즙산 생합성의 마커인 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4)을 HPLC에서 측정한다.

(다) 간지방 수준

① 영상진단

영상진단은 간초음파(liver ultrasonography), CT, MRI, MRS 등을 이용하여 진단한다. 간초음파는 정상적인 간에서는 신장과 비슷한 정도의 밝기를 보이지만, 지방간의 경우 지방 침착으로 신장보다 훨씬 밝게 판정된다. 간의 지방증은 Saverymattu et al의 방법에 따라 간 실질조직, 간과 신장의 초음파 차이, 간 심층부의 초음파 침투, 간 정맥벽의 선명도에서 비롯된 비정상적인 초음파 강도로 결정한다.

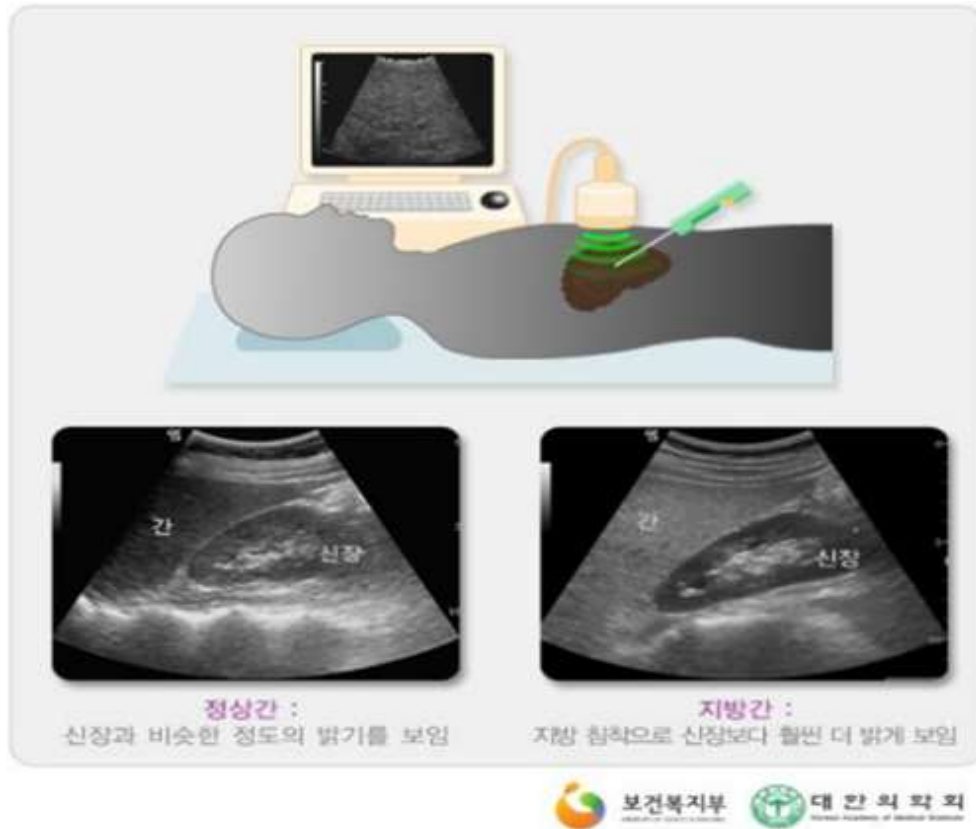


그림 22. 정상적인 간과 지방간의 초음파 검사 소견
[출처: 국가건강정보포털 <http://health.mw.go.kr>[101]]

② 실험실적 방법

■ 지방구 염색법(Oil-red O staining)

Oil Red O 염색을 통해 붉게 염색된 HepG2 세포 내 지방용적을 이소프로판올(isopropanol)로 녹여내어 용출 정도를 통해 세포내 지방 축적 정도를 측정한다. 510 nm에서 분광광도계로 측정 시 OD값이 높을수록, 지방축적이 많이 된 것으로 판단한다.

■ 세포 또는 조직 내 중성지방 정량

바이알에 각 시료를 취한 후 chloroform과 methanol을 2:1(v/v) 혼합한 Folch 용매를 넣고, 20분간 격렬히 반응시킨 후 하층액을 포집한다. Folch 용매 바이알에 넣은 후 위와 같은 방법을 2회 반복한다. 포집된 하층액에 0.88% NaCl 용액을 넣은 후, 원심분리하고 두 층으로 분리한 후 하층부만 취하여 sodium sulfate column

으로 수분을 제거하였다. 질소 가스를 이용하여 잔존 용매를 제거하고, 추출한 유지의 양을 측정한다.

$$\text{Fat contents(\%)} = \frac{V1 - V0}{S} \times 100$$

V0 : Weight of the vial(g)
 V1 : Weight of the vial(g) and crude fat(g)
 S : Weights of the sample(g)

■ H&E (hemotoxylin & eosin)염색법

H&E staining은 파라핀에 고정된 동물의 조직을 section 하며, 일반적으로 5~20 μm 단위로 아주 미세하게 조직을 칼날로 자른 후 절편을 만들어 염색한다.

(라) 지방대사

① 혈중지질수준

보통 총콜레스테롤(total cholesterol), HDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 함량을 혈장에서 측정한다.

② 지방 합성 또는 분해 관련 효소

지방합성 및 분해 관련 효소는 AMPK, FAS, ACC, SCD, GPAT, FAT, CPT, HSL 등으로 RT-PCR 이나 western blot으로 측정한다.

③ 지방 합성 또는 분해 관련 전사인자

지방 합성 및 분해 관련 전사인자는 SREBP-1c, C/EBP 등을 이용하여 RT-PCR 이나 western blot으로 측정한다.

④ 인슐린신호전달 (pAkt, pGSK, pFoXo)

세포, 혈청 또는 조직에서 ELISA 또는 western blot으로 측정한다.

⑤ 아디포넥틴

혈청 또는 조직에서 ELISA 또는 western blot으로 측정한다.

(마) 지방산 산화

① SREBP1c, PPAR- α , CD36, NAD⁺/NADH

간에서 SREBP1c, PPAR- α , CD36의 mRNA 발현을 real time PCR로 측정한다, 간의 NAD⁺와 NADH 함량을 ELISA kit 로 측정하여 NAD⁺/NADH를 계산한다.

(바) 지단백 분비

① VLDL 지질수준

VLDL 함량을 혈액을 Ultracentrifugation하여 VLDL을 분리하여 측정하거나 중성 지방 함량을 비색 정량 kit로 측정하여 예측한다.

(사) 에너지 상태

① NAD⁺/NADH ratio

조직 또는 혈청을 수집하고 NAD⁺/NADH Quantification Colorimetric Kit를 사용하여 측정한다.

(아) 염증반응

① 사이토카인(cytokines)

혈청 또는 조직에서 ELISA 또는 western blot으로 측정한다.

② Fragmented CK-18

혈청 또는 조직에서 ELISA 또는 western blot으로 측정한다.

(자) 항산화작용

① 지질과산화물

세포모델에서 HepG2 세포에서 측정 가능하며, 동물모델에서는 간조직, 혈장, 적혈구 등에서 측정할 수 있다. 사람의 경우 혈장과 적혈구에서 측정하는 것이 일반적이다. 혈청에서 thiobarbituric acid reactive substance assay kit를 사용하여 MDA를 흡수 515 nm와 552 m 방출파장에서 흡광도를 측정한다. MDA 농도는 1,1,3,3-tetraethoxypropane으로 표준 곡선으로 계산한다.

② 항산화효소

항산화 효소 중 과산화물 제거효소(superoxide dismutase, SOD), 카탈라아제(catalase, CAT), glutathione peroxidase(GPx) 등의 활성을 혈장이나 적혈구에서 측정한다. 간 조직을 얼음 위에서 0.9% NaCl로 균질화하여 10%(w/v) 균질액을 얻

고, 1000g에서 10분간 원심분리한 상등액을 각 효소의 상용kits로 검출하거나 SOD는 Oyanagui법, CAT는 Aebi법 으로 측정한다. 또한, GPx는 간 조직을 GPx buffer(100 mM potassium phosphate with 1 mM EDTA pH 7.7), 40 mM sodium azide, GSH(diluted in 5% metaphosphoric acid), GR(GPx diluted in buffer), NADPH(diluted with sodium bicarbonate 5%), and 0.5 mM tert-butyl와 배양한 후 NADPH 농도의 저하를 340nm에서 10분간 측정한다.

③ 비효소적 항산화 체계

세포 모델에서는 주로 HepG2 세포 내 함량을 측정하기도 하고, 동물모델에서는 간조직 내 함량 또는 혈중 수준을 측정하기도 한다. 인체에서는 조직 내 함량 측정이 어렵기 때문에 혈중 수준을 측정하는 것이 일반적이다. 환원형 글루타치온과 산화형 글루타치온을 함께 측정하여 총 글루타치온 함량 뿐만 아니라 환원형:산화형 비율을 구하기도 한다. 환원형 글루타치온은 GR buffer (200 mM sodium phosphate pH 7.5, 6.3 mM EDTA)를 이용하여 Sample 내 NADPH 농도의 감소를 340nm 파장에서 10분간 측정한다.

(차) 간세포 사멸

① Apoptosis pathway

신경세포사멸을 확인하기 위하여 caspase 활성화, caspase/ cleaved caspase, Bcl-2, Bax, MAPK(p-JNK, p-ERK, p-p38 protein) 등의 단백질 발현 정도를 western blot을 통해 측정한다. MAPK pathway관련 인자들은 PCR 및 western blot을 이용하여 측정한다. Bcl-2 및 Bax의 측정은 Western blot을 수행하거나 간 조직을 immunohistochemistry kit와 항체를 이용하여 발색시킨 후 핵막의 갈색, 노란색의 과립 및 간세포의 세포질을 양성발현으로 간주, 광학현미경으로 총 간세포 수와 양성 발현 세포수를 세어 측정한다.

(2) 대사이상 관련 요인

(가) 임상증상 개선

① 다차원피로척도(multi-dimensional fatigue inventory)

전반적 피로도, 일상생활기능장애, 상황적 피로도를 측정할 수 있는 설문지이며, 대상자가 지난 2주 동안 느꼈던 피로도에 대해 응답하도록 되어 있다. 1점~7점까지의 척도로 응답하며, 총점이 높을수록 피로도가 높다고 판단한다.

항 목	전혀 아니다	←	←	보통 이다	→	→	매우 그렇다
*1. 나는 피로하면 나른해지고 졸림을 느낀다.							
*2. 나는 피로할 때 인내심이 떨어진다.							
*3. 나는 피로하면 일할 의욕이 나질 않는다.							
*4. 나는 피로하면 집중력이 떨어진다.							
*5. 나는 운동을 하고 나면 피로해진다.							
*6. 나는 더우면 피로를 느낀다.							
*7. 나는 스트레스를 받으면 피로를 느낀다.							
*8. 나는 우울해지면 피로를 느낀다.							
*9. 온도가 시원해지면 피로가 감소된다.							
*10. 나는 쉽게 피로를 느낀다.							
*11. 피로로 인하여 업무 능률이 떨어진다.							
*12. 피로 때문에 문제가 자주 발생한다.							

항 목	전혀 아니다	←	←	보통 이다	→	→	매우 그렇다
*13. 피로를 느낄 때 시간이 많이 걸리는 작업을 하면 능률이 떨어진다.							
*14. 피곤하면 임무를 수행하는 데에 어려움을 느낀다.							
*15. 몸에 어떤 증상이 생기기 전에 먼저 피로를 느낀다.							
*16. 피로는 나를 가장 무기력하게 만드는 증상이다.							
*17. 피로는 가장 심각한 3가지 증상 중의 하나이다.							
*18. 피로는 일, 가족, 정상적인 사회생활을 방해한다.							
*19. 나는 피곤하면 다른 증상들이 더욱 악화된다.							

② FSS (Fatigue severity scale) 설문지

단일 차원을 가진 9문항의 자가보고형 설문이며, 지난 1주일간의 피로에 관한 각각의 문항에 어느 정도 동의하는지 1점에서 7점까지 부여하도록 구성된 라이커트 (Likert)형 척도이다. 총점은 문항별 점수의 평균으로 계산하며 총점이 높을수록 피로가 심하다고 판단한다[103].

항목	전혀 아님		중간			그렇다	
	1	2	3	4	5	6	7
피로할 때는 어떤 일도 하고 싶지 않다							
운동을 하면 피로해진다							
나는 쉽게 피로해진다							
피로할 때에는 신체적인 기능이 떨어진다							
나는 피로 증상 때문에 자주 문제가 생긴다							
피로 증상 때문에 신체적인 활동을 지속하지 못한다							
피로할 때에는 임무와 책임을 다하는데 어려움을 느낀다							
피로는 내가 일을 하지 못하게 하는 4개 증상 중 하나다							
피로하면 나는 업무, 가정, 사회 생활에 지장을 받는다							

총점≥30점: 의사 진료 필요

③ CIS (Checklist individual strength) 설문지

20가지의 문항으로 구성되어 있으며 주관적 피로도 8문항, 집중력 감소 5문항, 동기 감소 4문항, 신체활동 감소 3문항으로 구성되어 있다. 지난 2주간 경험한 피로에 대해 1점~7점까지의 척도로 응답하며, 총점이 높을수록 피로도가 높다고 판단한다. 점수가 높으면 높은 수준의 피로와 더 많은 집중력 문제, 낮은 동기 낮은 활동을 나타낸다.

	네 가끔 그렇다								아 니 그렇다
(1)나는 피곤하다.									
(2)나는 매우 활동적이다.									
(3)생각하는 것이 귀찮다.									
(4)몸이 기진맥진하다.									
(5)좋은 일은 어떤 것이던 하고 싶다.									
(6)나한테 딱 좋다고 느낀다.									
(7)나는 하루에 많은 일을 해 내고 있다.									
(8)무언가 하고 있을 때 매우 집중할 수 있다.									
(9)약자로 느껴진다.									
(10)하루 종일 많은 걸 못한다.									
(11)집중력이 있다.									
(12)몸을 쉬고 싶다.									
(13)집중하기 어렵다.									
(14)몸이 좋지 않다는 걸 느낀다.									
(15)하고 싶은 일로 꽉 차있다.									
(16)매우 쉽게 피로감을 느낀다.									
(17)하루 내내 해 놓은 것이 시원하지 않다.									
(18)무얼 하고자 하는 욕망을 느끼지 못한다.									
(19)생각이 쉽게 산만해진다.									
(20)신체적으로 좋은 모양새에 있다는 걸 느낀다.									

④ 만성피로증후군 (Chalder fatigue scale) 설문지

총 11문항으로 구성되어 있으며, 신체적 피로 7문항, 정신적 피로 4문항으로 구성된 4점 척도로 ‘평소보다 좋음’ 0점에서 ‘평소와 비슷함’ 1점, ‘평소보다 나쁨’ 2점, ‘평소보다 매우 나쁨’ 3점을 부여하여 총점의 범위는 최소 0점에서 최대 33점까지이고 점수가 높을수록 피로가 심함을 의미한다.

	<i>less than usual</i>	<i>no more than usual</i>	<i>more than usual</i>	<i>much more than usual</i>
do you have problems with tiredness?				
do you need to rest more?				
do you feel sleepy or drowsy?				
do you have problems starting things?				
do you lack energy?				
do you have less strength in your muscles?				
do you feel weak?				
do you have difficulties concentrating?				
do you make slips of the tongue when speaking?				
do you find it more difficult to find the right word?				
	<i>better than usual</i>	<i>no worse than usual</i>	<i>worse than usual</i>	<i>much worse than usual</i>
how is your memory?				

(나) 비만도

비만도를 측정하는 지표로는 체중, BMI, 허리둘레, 허리둘레:엉덩이둘레 비율 등이 있으며, 체중 (신발을 벗고 최소한의 옷을 입은 상태, 오차범위 100 g 이내), 신장(신발을 벗고 발뒤꿈치를 벽에 붙힌 상태에서 머리의 평평한 앞부분, 오차범위 0.5 cm 이내) 및 허리둘레(갈비뼈 끝과 장골능선 사이 측정)는 각각 전자저울, 스타디오미터, 비탄력성 테이프로 측정한다. 또한 생체전기저항법(Bioimpedance analysis) 또는 DEXA(dual energy X-ray absorptiometry)를 이용하여 체내 총지방량, 피하지방량, 내장지방량을 측정하기도 한다. 또한 컴퓨터단층촬영 (computed tomography, CT)을 통해 복부 총지방, 복부 내장지방, 복부 피하지방량 변화를 확인하기도 한다.

(다) 대사이상

① PPAR γ DNA methylation

정맥에서 혈액을 채취하고 혈액에서 DNA를 추출하여 amplicon PCR로 PPAR γ 의 DNA methylation을 확인한다[102].

(라) 인슐린저항성

① 혈중 포도당, 인슐린, 글루카곤(glucagon), C-펩타이드(C-peptide), 당화혈색소(HbA1c), 요산(uric acid), 호모시스테인(homocysteine)

혈중 포도당은 glucose oxidase method로 측정하고 인슐린, C-펩타이드는 혈청에서 글루카곤은 혈장에서 방사선면역측정법으로 측정한다. 당화혈색소, 요산, homocysteine은 정맥에서 혈액을 채취하여 측정한다.

② 인슐린 저항성 또는 민감성 지수

HOMA-IR(homeostatic model assessment of insulin resistance)은 인슐린 저항성을 측정하는 방법으로 공복혈당과 인슐린 수치 등을 이용하여 산출한다.

$$\text{HOMA-IR} = (\text{공복인슐린수치}(\text{microU/L}) \times \text{공복혈당}(\text{mmol/L})) / 22.5$$

(마) 지방간 예측 점수

① FLI (Fatty Liver Index)

지방간 예측 점수에 사용되는 항목과 측정 방법은 다음과 같다. 정맥에서 혈액을 채취하고 혈중 ALT, AST, HDL, TG, WBC, insulin, GGT 를 측정한다. 키, 체중, 허리둘레를 측정하고 BMI를 계산하여 예측에 사용한다. 예측 점수를 계산하는 방법은 다음과 같다.

• 대사이상관련 지방간 리지 점수 [43, 44]: ${}^a\text{NRS} : -0.614 + 0.007 \times \text{ALT} - 0.214 \times \text{HDL} + 0.053 \times \text{triglycerides} + 0.144 \times \text{HbA1c} + 0.032 \times \text{WBC} + 0.132 \times \text{hypertension}.$

• 대사이상관련 지방간 점수 [44, 45]: ${}^b\text{NLFS} : 1.18 \times \text{MS} + \text{T2DM} (2 \text{ if yes; } 0 \text{ if no}) + 0.15 \times \text{fasting insulin (mU/L)} + 0.04 \times \text{AST(U/L)} 0.94 \times (\text{AST/ALT}) 2.89.$

• 간지방증 지수 [46, 47]: $^cHSI : 8 \times (ALT/AST \text{ ratio}) + BMI(+2, \text{ if female}; +2, \text{ if T2DM})$.

• 지방간 지수 [48, 49]: $^dFLI : e^{0.953 \times \text{Loge}(TG)} + 0.139 \times BMI + 0.718 \times \text{Loge}(GGT) + 0.053 \times WC - 15.745 / [1 + e^{0.953 \times \text{Loge}(TG)} + 0.139 \times BMI + 0.718 \times \text{Loge}(GGT) + 0.053 \times WC - 15.745] \times 100$.

• 지질 축적 지수 [44]: $^eLAP : (WBC65) \times \text{triglycerides if male}; (WBC58) \times \text{triglycerides if female}$.

(3) 알코올 대사 및 관련 효소

(가) 알코올 대사

① 혈중 알코올 또는 알데히드의 수준 변화, 제거속도

일정량의 알코올 섭취 후 일정 시간 동안 관찰하여 알코올 또는 중간 대사산물인 알데히드의 혈중 수준 변화, 최고 농도(Cmax), 최고 농도 도달 시간(Tmax), 혈중 변화량에 대한 면적 (area under the curve, AUC), 반감기에 도달하는 시간 (T1/2), 혈중 수준이 0에 도달하는 시간(T0), 제거속도 등이 측정될 수 있다.

(나) 알코올 대사 관련효소

① Cytochrome P450 2E1(CYP2E1)

알코올이 대사되는 두 번째 경로는 마이크로솜(microsome)에 존재하는 알코올 산화 시스템 (microsomal ethanol-oxidizing system, MEOS)인데, 알코올을 과량 섭취했을 때에 가동 된다. 주로 CYP2E1이 관여하는데, 알코올을 만성적으로 섭취하는 경우에도 활성이 증가될 수 있다. 알코올로 지방간을 유도한 동물모델에서 지방조직 내 유전자 발현 또는 효소 활성을 측정할 수 있다. CYP2E1은 chlorzoxazone을 probe substrate로 하여 LS-MS/MS 또는 HPLC에서 측정할 수 있다. 간 조직을 칼륨-인산완충액(pH 7.4)에 chlorzoxazone, MgCl₂, NADPH와 함께 37℃에서 20분간 배양한 후 4'-hydroxytolbutamide를 함유한 차가운 ethyl acetate를 첨가하여 반응을 중단시킨다. 상등액을 모아 12,000 g에 10분간 원심분리한 뒤 30℃에서 건조시키고 잔류물을 분석한다.

② 알코올탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)

알코올성 간 손상 동물 모델에서 시험동물의 혈청에서 측정하거나 간 조직 내 유전자 발현을 측정할 수 있다. PCR과 western blot을 활용하여 측정한다.

③ 알데히드탈수소효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)

ALDH 효소는 PCR과 western blot을 활용하여 측정한다.

(4) 생체이물 관련 요인

(가) 배설능

① 빌리루빈(bilirubin)

빌리루빈은 혈청에서 측정하거나 간조직을 균질화하여 측정한다.

(나) 생체 이물 관련 간 효소

① Phase I 반응 효소

■ 사이토크롬 P450 1A2(cytochrome P450 1A2, CYP1A2)

동물 모델에서는 간조직의 마이크로솜을 분리한 후 MROD 활성을 측정하는데, 형광 수치가 높게 나올 경우 MROD 활성이 증가된 것으로 시험물질이 CYP1A2의 유도물질인 것으로 판단할 수 있다. 인체에서는 CYP1A2의 경우 소변으로 배설되는 카페인(caffeine)의 대사 속도를 측정하여 간 내 활성을 간접적으로 평가할 수 있다. 카페인은 체내에서 다양한 경로에 의해 대사되어 소변으로 배설되는데, 소변에서 1,7-dimethylxanthine, 1-methylxanthine, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil, 1-methyluric acid, 1,7-dimethyluric acid를 측정하여 카페인 대사 비율(caffeine metabolic ratio, CMR)을 계산하여 CYP1A2 활성을 가늠한다. phenacetin O-deethylation을 probe substrate로 하여 HPLC로도 측정할 수 있다.

■ N-아세틸기 전달효소(N-acetyl transferase, NAT), xanthine oxidase(XO)

동물모델에서는 간 조직 내 활성이나 발현 수준을 측정 가능하며, 인체연구에서는 NAT와 XO의 활성 역시 카페인 대사에도 관여하기 때문에 소변 내 카페인 대사 산물의 비율을 계산하여 간접적으로 간 내 활성을 예측할 수 있다. 간 조직을 얼음 위에서 0.9% NaCl로 균질화 하여 10%(w/v) 균질액을 얻고, 1000g에서 10분간 원심분리한 상등액을 각 효소의 상용 kit로 검출한다.

② Phase II 반응 효소

GST- α 의 활성과 발현을 측정한다. 혈청에서 쉽게 측정 가능하며, 타액 내 수준이 조직 수 준을 반영하는 것으로 보고되고 있어 타액에서도 측정하는 경우가 많다. Glutathione S-transferase활성은 1-chloro-2,4-dinitrobenzene을 효소 기질로 사용하여 340 nm에서 흡광도를 측정한다. 흡광도 측정 후 GST 활성을 계산한다.

(5) 유전 관련 요인

(가) PNPLA3 rs738409, GGT1 (rs2006227), HNF1A (rs1183910)

검사 대상자의 유전자 검사 동의를 얻은 후 구강세포 혹은 타액을 얻고, 구강세포나 타액에서 DNA를 분리하여 유전자증폭기를 사용하여 검사 대상자의 유전형을 확인한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관시험

(1) 시험계

HepG2 등의 간세포를 이용하여 시험관 시험에 사용한다.

(2) 바이오마커

원료의 작용 기전을 설명하기 위하여 예상되는 대사 경로에 위치하고 있는 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 동물시험

(1) 실험동물

간 건강 관련 효과를 평가하기 위한 동물실험에는 랫트(rat), 마우스(mouse), 돼지(pig) 모델을 일반적으로 사용된다. 실험동물에서 과영양으로 유발하는 대사이상을 동반하는 지방간은 MCD 식이, 고지방, 고콜레스테롤식이 등을 통해 지방간을 유도할 수 있으며, 유전적으로 비만이나 당뇨를 유발하고 지방간 동반 유발하는 ob/ob와 db/db mice가 있다. 알코올성 지방간의 동물 모델은 동물에게 장기간 과량의 알코올을 투여하여 유도한다. 또한, lipopolysaccharide (LPS), 박테리아 endotoxin, D-galactosamine 등을 투여하여 간염을 유발 모델이 있으며, trt-BHP, D-galactose, acetaminophen 등으로 산화적 스트레스를 유발로 유도되는 간염 유도모델도 사용되고 있다. Pyrogallol 유도 간암유발 모델도 있다. 대사이상관련 간의 지방 축적 및 알코올 섭취로 인한 관련이 있는 동물 모델의 예시로 주었다.

표 4. 동물모델 사례

동물모델	유도방법
과영양성 지방간 유도모델	MCD diet-induced fatty liver
	Alloxan-induced diabetes&high fat-induced fatty liver
	High-fat/sucrose diet-induced fatty liver
	High cholesterol diet induced fatty liver/atherogenic stress
알코올성 지방간 유도모델	alcohol-induced fatty liver
과영양성 간염 유도모델	MCD diet-induced steatohepatitis
	High-fat diet-induced steatohepatitis
알코올성 간염 유도모델	Alcohol-induced hepatic fibrosis
장 기능이상 간염 유도모델	d-galactosamine-induced acute liver injury
	Bacterial endotoxin-induced liver injury
	LPS-induced liver injury
산화적 스트레스성 간염 유도모델	Tert-BHP induced hepatotoxicity
	D-galactose induced liver damage
	Acetaminophen-induced liver damage
	DMN-induced liver injury
	D-GaIN-induced acute liver injury
	Doxorubicin induced liver damage
	Ischemia/reperfusion injury
	CCl4-induced hepatotoxicity
간암유도모델	pyrogallol-induced carcinogenic stress

(2) 바이오마커

실험동물을 대상으로 원료의 작용 기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다.

(3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

다. 인체적용시험

(1) 시험 대상

(가) 시험대상자 선정 기준 (예시)

○ 대사이상으로 인한 간손상으로부터 간 건강에 도움을 줄 수 있음

- 만 19-75세
- 영상의학적 방법(초음파, CT, MRI 등)으로 지방간이 확인된 자
- AST, ALT, γ -GTP 수준이 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배미만의 범위에 있는 자

○ 알콜성 간손상으로부터 간 건강에 도움을 줄 수 있음

- 만 19-75세
- 1개월 이내에 일주일 평균 남성 210 g, 여성 140 g 이상의 알코올 섭취 습관을 가진 자
- AST, ALT, γ -GTP 수준이 정상치를 초과하고 정상 상한치의 3배 미만의 범위에 있는 자

(나) 시험대상자 제외 기준 (예시)

- 약물복용
 - 약물중독자
 - 최근 3개월 이내 MASLD와 관련된 약물, 항MASH 약물(Resmetirom, GLP-1 RA, 티아졸리딘디온, 비타민 E), 최근 3개월 불안정 용량의 경구 혈당강하제, 스타틴 또는 피브레이트를 사용한 자
 - 장기약물복용이 필요한 자: 항결핵제, 비스테로이드성 소염진통제, 이담제, 간장질환제 등
 - 병용 시 간기능을 악화시킬 우려가 있는 약물복용의 경우: acetaminophen, amoxicillin, amiodarone, chlorpromazine 등

○ 질병상태

- 간경변 혹은 다른 형태의 만성 간 질환자
- 간담도기능이 저하된 자로 AST, ALT, 또는 total bilirubin 수준이 정상 상한치의 3배 이상인 자
- 조절되지 않는 당뇨 혹은 HbA1c 7.0% 초과(단, 티아졸리딘디온 또는 인슐린 등을 투여 받지 않는 제2형 당뇨병환자는 포함)
- Creatinine clearance <60 mL/min/1.73 m²(CKD-EPI 공식 계산)
- 간독성 약물에 대한 이전 노출 또는 증거(임상 또는 조직학적)
- 위장관 우회술 또는 지방증을 유발하는 약물과 같은 지방간 이차 원인의 존재
- BMI 35 kg/m² 이상

○ 생리적 상태

- 임신부 및 수유부 또는 임신 계획이 있는 자

○ 생활습관

- 알코올 섭취 [남자 ≥ 40 g/일, 여자 ≥ 20 g/일]
(단, 알코올 섭취량 제외기준은 대사이상 지방간 시험대상자에 한함)
- 과도한 흡연자 (≥ 20 개비/일)

○ 알레르기

- 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자

○ 기타

- 단백질 제한 식이요법을 하는 자
- 시험 시작 3개월 이내에 해당 기능성과 관련된 건강기능식품을 복용한 자
- 최근 3개월 내 다른 임상시험에 참가한 자
- 연구자의 판단에 의해 해당 연구에 부적합하다고 판단되는 자

(2) 시험설계

- 무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다.

- 유효성 평가 결과에 영향을 미칠 수 있는 혼동 요인으로 기초특성 항목(식이섭취, 신체활동량, 음주 및 흡연 습관, 비만도, 혈당 수치 등)의 섭취군 간 차이 및 이를 고려한 유효성 지표 결과를 확인한다.

(3) 바이오마커

주요 바이오마커인 간 영상은 초음파, CT(computer tomography), MRI 등으로 측정한다. 원료의 작용 기전을 설명하기 위해 바이오마커의 양, 활성, 단백질 발현, mRNA 발현 등을 측정한다. 바이오마커는 기전별로 다양한 지표들이 포함되어 있기 때문에 연구 목적에 부합하는 기전을 선정하고, 관련된 바이오마커의 결과에 일관성이 나타나야 한다(Ⅲ. 기능성 시험방법 1. 가. 연구유형별 바이오마커 참고).

(4) 통계처리

인구학적 자료 및 기초특성의 측정지표에 대한 통계분석 방법을 기술하고 분석군(ITT, FAS, PP)에 대해 명확하게 정의하여 주분석군 설정에 대한 설명이 계획서와 결과보고서에 기술되도록 한다. 또한, 기능성 평가지표에 대한 통계분석방법 및 중도탈락자 및 결측 처리에 대한 통계분석 방법을 명확히 한다. 연구 개시 후 측정시기 및 방법의 변화가 있는 경우, 그 변경 사유를 기술하여야 하며, 층화 분석, 보정분석 등이 제출된 경우, 사전 계획 여부가 기술되도록 한다. 이때, 각 군별 기능성 평가지표에 대한 분석 결과에 사용된 통계분석 방법, 군간 통계적 유의성, 시험대상자 수, 평균, 표준편차 등이 확인될 수 있도록 하여야 하며 통계분석 방법의 변경이 있는 경우, 변경사항에 대해 기술하도록 한다. 시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

1. 종속변수가 범주형일 경우

- 범주형 변수는 크게 명목 척도와 순위 척도로 구분할 수 있음
 - 명목 척도 : 성별, 국가, 흡연 여부 등 연속되지 않으며 범주 간 서열이 존재하지 않는 범주형 척도
 - 순위 척도 : 질병의 병기(1기, 2기, 3기) 등 연속되지 않으나 범주 간 서열이 존재하는 범주형 척도
- 연속형 변수는 수치화된 변수로 연속성이 있으며, 평균, 표준편차 등을 계산할 수 있는 변수임

1.1. Chi-square test

- 두 군간의 차이를 비교할 때 사용됨
- * 빈도가 5 미만인 항목이 있는 경우 Fisher's exact test를 사용

1.2. McNemar's test

- 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

2. 종속변수가 연속형이고 비교군이 2개일 경우

※ 연구 내 비교군이 2개(대조군, 시험군)일 경우 사용되는 분석 모델임

2.1. Paired T-test : 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

2.1.1. Wilcoxon's signed-ranks test

- 군 내의 전후 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포를 따르지 않는 경우 사용됨

2.2. Independent T-test : 두 군간의 차이를 비교할 때 사용됨

2.2.1. Wilcoxon's rank sum T-test

- 두 군간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포*를 따르지 않는 경우 사용됨

2.3. Linear mixed effect model

- 유효성 평가 지표 측정 시점이 3회 이상일 경우 사용할 수 있음*

* 방문 시점 간의 공분산 구조(covariance structure)를 결정하여 분석에 적용할 수 있는 모델이며, 효과의 크기(slope), linear function의 절편(intercept) 등의 방문시점, 대상자 등에 따른 고정효과(fixed effect) 또는 무작위효과(random effect)의 여부를 결정하여 model안에 혼합(mixed effect)하여 적용할 수 있음

3. 종속변수가 연속형일 경우 AND 비교군이 3개 이상일 경우

※ 연구 내 비교군이 3개(대조군, 시험군1, 시험군2 등)일 경우 사용되는 분석 모델임

3.1. ANOVA(Analysis of variance) : 군 간의 차이를 비교할 때 사용

3.2. Kruskal Wallis test : 군 간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포를 따르지 않는 경우 사용

※ 변수 분포의 정규성 검정

- 정규성 검정 방법은 Kolmogorov-Smirnov test, Shapiro-Wilk test 등의 방법으로 검정할 수 있음. 일반적으로 p value가 0.05 미만일 경우, 정규분포를 따르지 않는 것으로 판단함. 그러나 현실에서 해당 기준에서 정규분포를 따르는 경우가 많지 않으므로, p value가 0.05 이상이라도 marginal한 p value를 확인하거나 Q-Q plot을 육안으로 확인하는 등 연구자가 자의적으로 정규분포를 따르는 것으로 판단할 수 있음
- 군 당 sample size가 30 이상인 경우, 중심극한정리를 이용하여 정규성을 가정하는 경우가 있음. 그러나 중심극한정리는 표본집단이 대표하는 모집단이 무한모집단이라는 가정 하에 사용됨. 즉, 모집단에 대한 가정이 불확실한 경우 또는 유한모집단인 경우가 있으므로 군 당 sample size가 30 이상이라고 해도 정규성 검정이 필요할 수 있음. 또한 30명이라는 기준은 연구자가 임의적으로 설정한 것임을 고려하여 절대적인 기준이 되지 않을 수 있음

4. 교란변수 보정이 필요한 경우

- Randomized Clinical Trial(중재연구)은 randomization을 통해 대상자가 군에 배정되므로, 교란변수를 통제할 수 있는 설계의 연구임. 그러나 우연에 의해 baseline의 특성이 군 간 차이를 보이는 경우가 발생할 수 있음. 이럴 경우, 연구자는 해당 변수를 공변량(covariate)으로 model에 포함시켜 분석할 수 있음. 그러나 가능할 경우, randomization block으로 생성하여 randomization 단계에서 층화무작위배정 등으로 미리 불균형을 방지하는 것이 바람직할 수 있음

4.1. ANCOVA

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가할 수 있음

4.2. Linear mixed effect model

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가할 수 있음

4. 안전성 평가

인체적용시험에서 시험물질의 섭취로 인한 안전성 평가를 위해 활력징후, 심전도 검사, 혈액학적·혈액화학적 검사, 뇨검사를 실시하는 것이 일반적이며 기능성 원료의 특성과 기능성 내용에 따라 안전성 평가항목이 추가될 수 있다.

※ [참고] 안전성 검사항목(예시)

- (활력징후) 체중, 체온, 맥박, 혈압 등
- (혈액학적 검사) WBC, RBC, Hb, Hct, PLT, MCV, MCH, MCHC, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil 등
- (혈액화학적 검사) AST, ALT, BUN, creatinine, glucose, total protein, albumin, total cholesterol, LDL, HDL, triglyceride, GGT, ALP, CPK, LDH 등
- (뇨검사) pH, Nitrite, specific gravity, Protein, Glucose, Ketone, Bilirubin, Blood, Urobilinogen, Color 등

IV

참고문헌

1. 식품의약품안전처, 건강기능식품 기능성 원료 및 기준. 규격 인정에 관한 규정.
2. R, Weiskirchen., S, Weiskirchen, and F, Tacke. Recent advances in understanding liver fibrosis: bridging basic science and individualized treatment concepts. . F1000Res. pii: F1000 Faculty Rev-921, 2018. 27(7).
3. 식품의약품안전평가원, 건강기능식품 기능성 평가가이드-간 건강에 도움을 줄 수 있음. 2015.
4. 변기원, et al., 고급영양학. 2016.
5. U, Protzer., Maini. MK, and Knolle. PA, Living in the liver: hepatic infections. Nat Rev Immunol, 2012. 24(12(3)): p. 201-213.
6. 서상혁 and 이영웅, 건강검진 수진자에서 비알콜성 지방간질환의 유병률 및 연관 인자들. 대한내과학회지, 2006. 70: p. 26-32.
7. 박중원 and 유병철, 비알콜성 지방간의 진행: 지질 과산화, 미토콘드리아 장애 및 싸이토카인의 역할. 대한소화기학회지, 2001. 38: p. 1-8.
8. 손주현 and 김태엽, 비알코올성 지방간질환의 발병기전에 대한 최신지견. 대한내과학회지, 2010. 79(5): p. 461-474.
9. Zeng, M., et al., Problems and Challenges Associated with Renaming Non-alcoholic Fatty Liver Disease to Metabolic Associated Fatty Liver Disease. Medicine (Baltimore). 2023 Jul;3(3):105-13. doi: 10.1097/ID9.0000000000000085. Epub 2023 Apr 3.
10. Eslam, M., et al., A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. J Hepatol, 2020. 73(1): p. 202-209.
11. Segura-Azuara, N., C.D. Varela-Chinchilla, and P.A. Trinidad-Calderón, MAFLD/NAFLD Biopsy-Free Scoring Systems for Hepatic Steatosis, NASH, and Fibrosis Diagnosis. Front Med (Lausanne), 2021. 8: p. 774079.
12. Ye, Q., et al., Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. 2020. 5(8): p. 739-752.
13. Perumpail, B.J., et al., Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. 2017. 23(47): p. 8263.
14. 전재한 and 박근규, 비알코올성 지방간의 정의, 병인, 자연경과. 대한당뇨병학회지, 2014. 15: p. 65-70.
15. 정고은 and 김동희, 비알코올 지방간 질환의 역학. 대한내과학회지, 2014. 84(4): p. 399-404.

16. 박정현, 인슐린 저항성과 비알콜성 지방간. 대한간학회, 2006. 12: p. 16-30.
17. JD, Browning and JD, Horton, Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest, 2004. 114(2): p. 147-152.
18. J, Yang., Fernandez-Galilea M., et al., Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: effects of omega-3 fatty acid supplementation. Nutrients, 2019. 11(4): p. 872-908.
19. O, Ramos-Lopez., E, Martinez-Lopez., et al., Genetic, metabolic and environmental factors involved in the development of liver cirrhosis in Mexico. World J Gastroenterol, 2015. 21(41): p. 11552-66.
20. Yamada, H., et al., Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. 2013. 424: p. 99-103.
21. Kim, G.A., J.H. Moon, and W. Kim, Critical appraisal of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: Implication of Janus-faced modernity. Clin Mol Hepatol, 2023. 29(4): p. 831-843.
22. Yip, T.F., et al., Laboratory parameter-based machine learning model for excluding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the general population. 2017. 46(4): p. 447-456.
23. Drescher, H.K., S. Weiskirchen, and R.J.C. Weiskirchen, Current status in testing for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). 2019. 8(8): p. 845.
24. Kotronen, A., et al., Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. 2009. 137(3): p. 865-872.
25. Lee, J.-H., et al., Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. 2010. 42(7): p. 503-508.
26. Jeong, S., et al., Development of a simple nonalcoholic fatty liver disease scoring system indicative of metabolic risks and insulin resistance. 2020. 8(21).
27. Bedogni, G., et al., The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. 2006. 6: p. 1-7.
28. Calori, G., et al., Fatty liver index and mortality: the Cremona study in the 15th year of follow-up. 2011. 54(1): p. 145-152.
29. Seitz, H.K., et al., Alcoholic liver disease. Nat Rev Dis Primers, 2018. 4(1): p. 16.
30. Rehm, J., et al., Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. 2010. 29(4): p. 437-445.
31. Bellentani, S. and C.J.J.o.h. Tiribelli, The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. 2001. 35(4): p. 531-537.

32. S, Zakhari. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*, 2006. 29(4): p. 245-254.
33. P, Ramadori., et al., Alcohol and hepatocellular carcinoma: adding fuel to the flame. *Cancers (Basel)*, 2017. 9(10): p. 130-151.
34. Hyun, J.Y., et al., Microbiome-Based Metabolic Therapeutic Approaches in Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci*, 2022. 23(15).
35. JC, C., Nutritional aspects of detoxification in clinical practice. *Altern Ther Health Med.*, 2015. 21(3): p. 54-62.
36. 김경아, 간기능검사의 이해와 적용. *대한내과학회지*, 2009. 76(2): p. 163-168.
37. 김윤준, 간기능 검사 해석. *대한소화기학회지*, 2008. 51: p. 219-224.
38. López-Pastor, A.R., et al., miRNA Dysregulation in the Development of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and the Related Disorders Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Front Med (Lausanne)*, 2020. 7: p. 527059.
39. Yu, C., et al., Association of glycated hemoglobin with the risk of advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease patients without diabetes. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2019. 43(1): p. 58-66.
40. Xie, Y., et al., Association of glycated hemoglobin with non-alcoholic fatty liver disease patients and the severity of liver steatosis and fibrosis measured by transient elastography in adults without diabetes. *BMC Endocr Disord*, 2022. 22(1): p. 220.
41. Wei, F., et al., Higher Serum Uric Acid Level Predicts Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Prospective Cohort Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. 11: p. 179.
42. Dai, H., et al., Association between homocysteine and non-alcoholic fatty liver disease in Chinese adults: a cross-sectional study. *Nutr J*, 2016. 15(1): p. 102.
43. Zhang, X., et al., Homocysteine inhibits pro-insulin receptor cleavage and causes insulin resistance via protein cysteine-homocysteinylation. *Cell Rep*, 2021. 37(2): p. 109821.
44. Berger, D., V. Desai, and S.J.C.I.d. Janardhan, Con: liver biopsy remains the gold standard to evaluate fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. 2019. 13(4): p. 114-116.
45. Zhang, J.-Z., et al., Nonalcoholic fatty liver disease: an update on the diagnosis. 2019. 19(3): p. 187.
46. Eguchi, Y., et al., Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in Japan: a targeted literature review. 2020. 50(6): p. 645-655.
47. Papatheodoridi, M. and E.J.C.p.d. Cholongitas, Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): current concepts. 2018. 24(38): p. 4574-4586.

48. Zhang, F., et al., Predictive value of a noninvasive serological hepatic fibrosis scoring system in cirrhosis combined with oesophageal varices. 2018. 2018(1): p. 7671508.
49. Younossi, Z., et al., Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. 2018. 15(1): p. 11-20.
50. 유정주 and 김상균, 비알코올성 지방간염의 진단. 대한내과학회지, 2018. 93(1): p. 33-37.
51. 이정현, et al., 대학교 재학생에서 fatigue severity scale의 신뢰도 및 타당도 연구. Korean J Biol Psychiatry, 2013. 20: p. 6-11.

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- 간 건강 관련 -

발 행 인 : 강석연

편 집 위 원 장 : 오금순

편 집 위 원 : 이순호, 김용무, 박유경, 서은채, 이재황,
이다선, 성예지, 전해련, 류다연, 김기옥,
최아영

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2025년 7월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구과
(043-719-4431)
