

図5 C型慢性肝炎における瀉血＋鉄制限食の治療効果<sup>14)</sup>

C型慢性肝炎患者のうちインターフェロン治療の適応外もしくは無効であった25例(M/F=17/8, 平均年齢54.1歳)に除鉄療法(瀉血＋鉄制限食)を行った。約1年間の経過で血清フェリチン値, ALT値, さらには酸化ストレスマーカーである8-isoprostane値も有意に低下した。

血療法の有効性についてはいくつかの報告があり<sup>19)</sup>, トランスアミナーゼのみでなくインスリン抵抗性までも改善したとする報告もある<sup>20)</sup>。しかし, 組織学的改善を評価として加えた報告はほとんどなく, 今後は瀉血療法によって肝線維化や発癌, さらには予後の改善が得られるのかを検証する必要がある。

### おわりに

ヘモクロマトーシスやアルコール性肝疾患に加え, C型肝炎やNASHなどのさまざまな慢性肝疾患においても, 鉄過剰がその病態進展に深く関与している。C型肝炎における鉄過剰には, hepcidinを代表とする鉄代謝関連遺伝子の発現異常が関与していると考えられる。インスリン抵抗性や動脈硬化性疾患の病態惹起における鉄過剰の重要性を鑑みると, 人類がより長寿を得るには「鉄のコントロール」といった命題を考慮しなければいけないのかもしれない。

### 文献

- 1) Reddy MB, Clard L : Iron, oxidative stress, and disease risk. *Nutr Rev* **62** : 120-124 (review), 2004
- 2) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al : Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306** : 2090-2093, 2004
- 3) Hershko C, Ianculovich M, Souroujon M : A hematologist's view of unexplained iron deficiency anemia in males : impact of *Helicobacter pylori* eradication. *Blood Cells Mol Dis* **38** : 45-53, 2006
- 4) Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W : Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes* **51** : 2348-2354, 2002
- 5) Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, et al : Hepatic iron accumulation is associated with disease progression and resistance to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* **22** : 1886-1893, 2007
- 6) Horiike S, Kawanishi S, Kaito M, et al : Accumulation of 8-nitroguanine in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* **43** : 403-410, 2005
- 7) Fujita N, Sugimoto R, Ma N, et al : Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis C and B. *J Viral Hepat* **15** : 498-503, 2007
- 8) Fujita N, Horiike S, Sugimoto R, et al : Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload

- in chronic hepatitis C patients. *Free Rad Biol Med* **42** : 353-362, 2007
- 9) Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, et al : Hcpidin expression in the liver : relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med* **13** : 97-104, 2007
  - 10) Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, et al : Sustained responders recover from impaired hepcidin secretion after peginterferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* **49** : 702-710, 2008
  - 11) Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N, et al : Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* **89** : 986-988, 1994
  - 12) Yano M, Hayashi H, Yoshioka K, et al : A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C : a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J Gastroenterol* **39** : 570-574, 2004
  - 13) Fujita N, Sugimoto R, Urawa N, et al : Influence of phlebotomy on iron-related gene expression levels in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* **42** : 326-327, 2007
  - 14) Kaito M, Iwasa M, Kobayashi Y, et al : Iron reduction therapy by phlebotomy reduces lipid peroxidation and oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* **41** : 921-922, 2006
  - 15) Mendler MH, Turlin B, Moirand R, et al : Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* **117** : 1155-1163, 1999
  - 16) Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al : Nonalcoholic steatohepatitis : An expanded clinical entity. *Gastroenterology* **107** : 1103-1109, 1994
  - 17) George DK, Goldwurm S, Macdonald GA, et al : Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* **114** : 311-318, 1998
  - 18) Fujita N, Miyachi H, Tanaka H, et al : Iron overload is associated with hepatic oxidative damage to DNA in nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18** : 424-432, 2009
  - 19) Sumida Y, Kanemasa K, Fukumoto K, et al : Effect of iron reduction by phlebotomy in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis : a pilot study. *Hepatol Res* **36** : 315-321, 2006
  - 20) Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al : Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia : evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* **102** : 1251-1258, 2007

## NAFLDにおける臓器間代謝連繋の不均衡

An imbalance of inter-organ metabolic communication in patients with NAFLD



岩佐元雄(写真) 竹井謙之

Motoh IWASA and Yoshiyuki TAKEI

三重大学大学院医学系研究科病態制御医学講座消化器内科学

◎非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、脂肪酸の肝への流入、肝での脂肪酸合成と酸化、肝からの放出といった諸相の不均衡により発症する。NAFLDの病態形成には、脂肪集積やアディポカインの作用異常により惹起される、肝・脂肪組織・骨格筋におけるインスリン抵抗性が大きな役割を担っている。NAFLDではインスリン抵抗性、アディポカインの産生・機能異常を基盤とした種々の経路が相互に連繋し、多くの場合、耐糖能異常、糖尿病に進展していく。



非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、インスリン抵抗性、脂肪細胞、骨格筋、アディポカイン

近年、ライフスタイルの欧米化を反映してわが国でも肥満や糖尿病の増加は顕著であり、非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)はもっとも高頻度にみられる肝疾患となった。かつて肥満や糖尿病に伴う脂肪肝は予後良好な可逆性の病変であると信じられてきたが、飲酒歴がないにもかかわらず、肝実質に炎症や線維化が出現し進行性の経過をとる非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)という疾患概念が登場し、NAFLDに対する認識は一変しつつある。現在ではNAFLDは単純性脂肪肝からNASHに至る幅広い疾患スペクトラムを包含する症候群として理解される。加えてNAFLDは内臓脂肪蓄積と密接に関連しており、両者は肝におけるインスリン抵抗性を惹起し、高血圧や高脂血症の発症にも深く関与する因子として注目を集めている。

本稿では、肝への脂肪蓄積とインスリン抵抗性との関連について概説するとともに、インスリン抵抗性やアディポカイン作用の偏倚を介した肝、脂肪細胞、骨格筋相互の病態連繋について概説する。

### NAFLDの成立機序

NAFLDは脂肪酸の肝への流入、肝での脂肪酸合成と酸化、肝からの放出といった諸相の不均衡により発症する。過食や肥満により遊離脂肪酸は門脈経由で肝に大量に輸送され、ミトコンドリアβ酸化系に基質の過剰負荷をもたらすとともに、基質濃度に依存した肝細胞でのトリグリセリド合成の増強が生じる。NAFLDではAMP-activated protein kinase(AMPK)活性の低下、liver X-activated receptor(LXR)αの活性化により、sterol regulatory element binding protein-1c(SREBP-1c)の肝内発現が増加し、acetyl-CoA carboxylase(ACC)などの脂肪酸合成酵素群の転写が亢進している<sup>1)</sup>。脂肪酸は肝細胞でミトコンドリアやペルオキシゾームでのβ酸化により代謝され、消費される。β酸化能はcarnitine palmitol transferase(CPT)による基質脂肪酸のミトコンドリアマトリックスへの転送により律則されるが、脂肪酸合成の中間代謝産物であるmalonyl-CoAはCPT活性を弱めることから、NAFLDにおいてはβ酸化が減弱している。

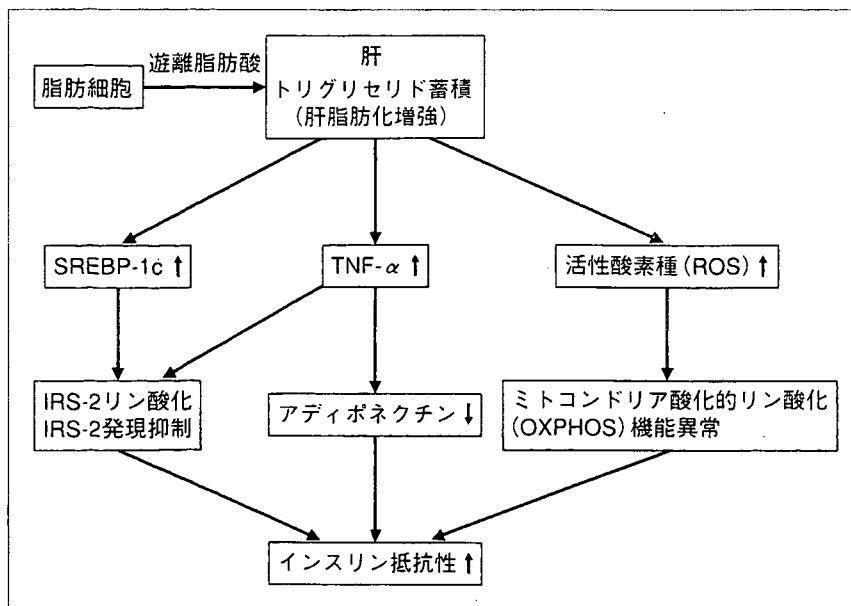


図 1 NAFLDにおける肝のインスリン抵抗性の発症機序

SREBP: sterol regulatory element binding protein, IRS: insulin receptor substrate.

### 糖代謝臓器としての肝

肝はグルコースの消費、産生、蓄積を介して血糖の恒常性維持に中心的な役割を演じている。空腹時にはグリコーゲンの分解によりグルコースを放出し、糖を新生して血糖値を維持する。一方、摂食後のエネルギー過剰状態では、インスリン作用によりグルコースを取り込んでグリコーゲンやトリグリセリドとして貯蔵する。グルコース負荷が継続すると、肝はより効率的なエネルギー貯蔵としてトリグリセリドへの転化を起こす。肝細胞への脂質の貯留自体はかならずしも病的状態とはいえないが、脂質の過剰蓄積は肝におけるインスリン抵抗性を惹起し糖尿病発症の要因となる。実際、NAFLD、NASHにおいてはインスリン抵抗性や耐糖能異常が高率にみられる。また、インスリン活性低下時には血中遊離脂肪酸が増加し、肝脂肪化がいつそう増悪するという悪循環を形成している<sup>2)</sup>。

### 肝におけるインスリン抵抗性の惹起(図 1)

肝では IRS-2 によるシグナル伝達が糖代謝の維持に重要であり、正常状態では空腹時にインスリン分泌が減り IRS-2 量は増大、摂食後には IRS-2 は減少する。NAFLD においては増加した脂肪酸、TNF- $\alpha$  や SREBP-1c 発現増強などにより、

肝内の IRS-1 や 2 のリン酸化が抑制され、インスリンの作用が减弱している。さらに、インスリン抵抗性下では持続的な高インスリン血症のために核内のフォークヘッド型転写因子 Foxo1 レベルが十分に増えないことや、発現が亢進している SREBP-1c の作用によって空腹時にも IRS-2 量が減少している。このように肝内脂肪蓄積が肝におけるインスリンシグナル遮断をきたし、肝の糖取り込み率が低下、糖放出率は上昇し、食後高血糖の主因となるとともに、重大な高血糖に発展しうる<sup>3)</sup>。

骨格筋でのインスリン抵抗性発症機序に、ミトコンドリア酸化的リン酸化(OXPHOS)の機能低下に起因するトリグリセリドの骨格筋細胞内蓄積が関与していることが報告された<sup>4)</sup>。その後、骨格筋、脂肪組織では OXPHOS を構成する遺伝子群の発現は低下し、肝では逆に発現が亢進していることが報告され、OXPHOS 遺伝子群の発現亢進が肝のインスリン抵抗性を形成し、発現低下は代償機転である可能性が提示された<sup>5)</sup>。

### インスリン抵抗性を基盤とした肝、脂肪細胞、骨格筋間の病態連繋(図 2)

脂肪細胞からの脂肪酸放出にはインスリンが重要な役割を担っている。脂肪組織でのインスリン

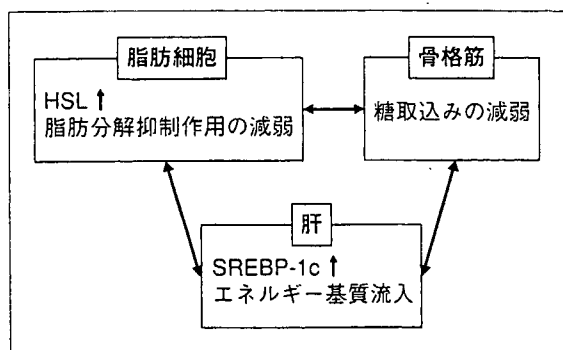


図 2 インスリン抵抗性状態における肝, 脂肪細胞, 骨格筋の連繋

抵抗性によりインスリンによるホルモン感受性リパーゼ(HSL)の抑制的制御が十分機能せず, 血中遊離脂肪酸が増加し, 肝への脂肪酸流入が増加, 脂肪肝の増悪に結びつく。また, リポ蛋白リパーゼ(LPL)の活性低下により血中から脂肪組織内への脂肪酸の取込みが減少することも, 脂肪肝増悪に関与する。高遊離脂肪酸血症は骨格筋においてIRS-1のリン酸化などを介して局所のインスリン抵抗性を惹起し, 肝に対してもインスリン抵抗性をきたし, 高インスリン血症を引き起こす。肝へのインスリンシグナルはその下流で脂肪酸合成を高め, 脂肪の蓄積を促進し, さらにインスリン抵抗性が惹起される。一方, 脂肪酸は解糖系酵素を阻害し, 糖新生系酵素を活性化することにより肝からの糖放出を促進すると考えられている。このようにインスリン抵抗性は各臓器に独立して存在するが, 同時に相互に複雑な連繋をもって耐糖能障害を引き起こす。

### アディポカインの役割

NAFLDは内臓脂肪型肥満と密接な関連がある。脂肪細胞は, 余剰なエネルギーをトリグリセリドとして蓄積するとともにアディポネクチン, TNF- $\alpha$ , レプチン, plasminogen activator inhibitor (PAI-1) などのアディポカインを分泌して, 食欲や糖・脂質代謝など広範な生体機能調節を行っている<sup>6)</sup>。アディポカインの織りなす情報のクロストークは, 肝局所, 脂肪組織, そしてさまざまな生体システムに広く展開して, きわめて複雑な細胞間・臓器・組織連関をもたらしている。病態下におけるその破綻・変調がいかなるものであるか解明を進

めることは, 肝脂肪化や炎症, インスリン抵抗性, 免疫系の攪乱, 線維化などNASHの諸病態を明らかにし, メタボリックシンドロームとの連繋を理解する手がかりを与えてくれる。

#### 1. アディポネクチン

① アディポネクチンと肝インスリン抵抗性発現……アディポネクチンは, IRS-1シグナルを介したPI3キナーゼの活性および膜輸送を高めること, また脂肪酸輸送蛋白1型の遺伝子発現増強による脂肪酸の酸化亢進, インスリン抵抗性を惹起するTNF- $\alpha$ の遺伝子発現の抑制など, 複数の経路によりインスリン感受性を促進する<sup>7)</sup>。また, アディポネクチンはAMPKを活性化し, 骨格筋における糖の取込みを促進し, 肝における糖の放出を抑制する。肝での糖新生抑制作用も知られている。また, アディポネクチンはより慢性的にはperoxisome proliferators activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )を活性化し, 骨格筋と肝のトリグリセリド含量が低下し, IRS-1や2を活性化することによってインスリン抵抗性を改善する(図3)。NAFLDにおいては血中アディポネクチン濃度が低下しており, インスリン感受性との相関も示されている<sup>8)</sup>。詳細な検討により, アディポネクチンの産生低下がNAFLDのインスリン抵抗性発症に深くかかわることが明らかとなってきた。さらにアディポネクチンを強く発現させると, ラット肝細胞での $\beta$ 酸化が促進され, 脂肪酸の消費が高まり, さらに, SREBP-1cが低下して脂肪酸合成が抑制される。また, PPAR $\alpha$ やAMPKを活性化し, 脂肪酸燃焼を亢進させ, 脂肪酸合成が抑制される。このように, 低アディポネクチン血症は脂肪肝の発症・増悪因子ともなりうる<sup>9)</sup>。

② 肝線維化への関与……肝類洞に存在する星細胞は肝障害の持続に伴い活性化し, 筋線維芽細胞様細胞へ形質転換することでコラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生し, 肝線維化に貢献する。この星細胞にはアディポネクチン受容体が発現しており, 高分子アディポネクチンは星細胞の活性化を阻害するとともに<sup>10)</sup>, 活性化星細胞に選択的にアポトーシスを誘導することにより抗線維化作用を示す。このようにアディポネクチンはNAFLDからNASHに至る過程においても他の肝

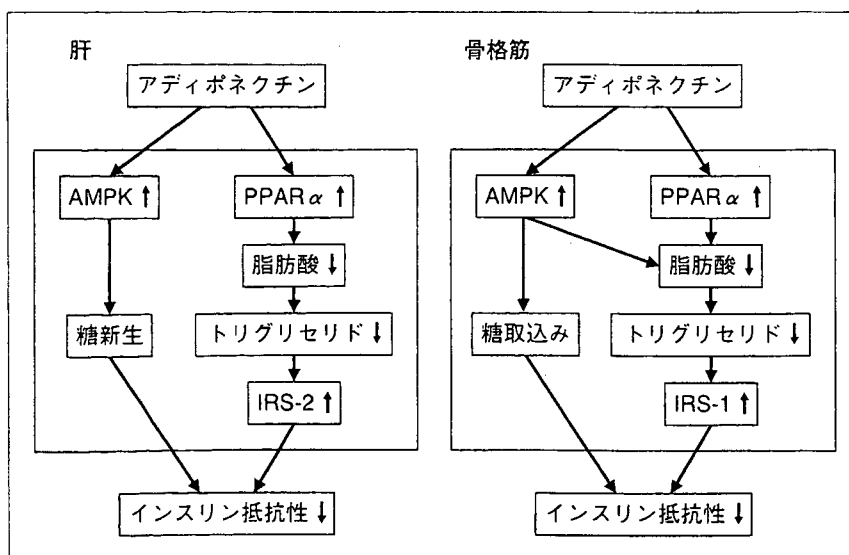


図3 アディポネクチンによる肝、骨格筋におけるインスリン抵抗性改善機序  
 AMPK: AMP-dependent protein kinase, PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferators activated receptor  $\alpha$ , IRS: insulin receptor substrate.

障害進展因子に拮抗する“善”の作用を示す。

## 2. TNF- $\alpha$

NASHではTNF- $\alpha$ の発現が肥満度や高インスリン血症、肝障害の程度と相関することが報告されている。TNF- $\alpha$ は、IRS-1をリン酸化することで筋肉、脂肪組織、肝においてインスリン抵抗性を惹起し、耐糖能異常発症に関与する。また、TNF- $\alpha$ はアディポネクチンの遺伝子転写を抑制することによりその作用を減じ、耐糖能異常を増悪させる。TNF- $\alpha$ はまた脂肪肝を進展させる作用をもち、これはSREBP-1cの転写亢進を介した脂肪酸合成の促進と説明されている<sup>11)</sup>。

## 3. レプチン

レプチンは脂肪細胞に特異的に発現し、中枢性に作用して摂食を抑制する。レプチンはまた、骨格筋のAMPK活性化およびACC活性化阻害を有し、脂肪酸 $\beta$ 酸化を促進することによりエネルギー消費促進作用を発揮する。NAFLDでは高レプチン血症が頻繁に認められ、レプチンの作用が十分に機能しないレプチン抵抗性の状態にあると考えられている。また、肝脂肪化の程度とレプチンの間に相関が認められ、レプチンが肝の脂肪化に何らかの役割を果たしていることも示唆されている。

レプチンの肝障害過程での関与は多面的である。炎症が前面に出ている時期には炎症を抑制し、

線維化が進展する時期にはそれを促進する。NASHの進展過程においてレプチンは星細胞でも産生され、類洞内皮細胞やKupffer細胞をその作用点として、TGF- $\beta$ 産生や類洞リモデリングにかかわる遺伝子を誘導するとともに、platelet-derived growth factor (PDGF)の星細胞増殖作用を増強することにより肝線維化を促進させる<sup>12)</sup>。

## インスリン抵抗性を標的とした薬物治療

最近、NASHを対象に、PPAR $\gamma$ のリガンドであるチアゾリジン誘導体の効果を検証するパイロット研究が報告され、耐糖能異常のみならず、遊離脂肪酸、アディポネクチン、TNF- $\alpha$ 、さらには肝逸脱酵素、肝組織所見が改善されることが示された<sup>13)</sup>。このようにNASHはインスリン抵抗性を基盤とし、インスリン抵抗性に介入することが治療学的に正しいということの検証がなされつつある。

## おわりに

NAFLDでは肝、脂肪組織、骨格筋におけるインスリン抵抗性が相互に病態の進展・増悪因子となるとともに、臓器間代謝連繋の不均衡を生じる。また、アディポカイン作用の臓器間ネットワークのゆがみはインスリン抵抗性や耐糖能異常惹起に深くかかわっている。これらの分子機序を明らか

にすることは、NAFLD と糖代謝異常をめぐる病態  
連繋の意義を探るうえで重要であり、よりいっそ  
うの研究の進展が望まれる。

### 文献

- 1) Browning, J. D. et al. : Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.*, **114** : 147-152, 2004.
- 2) Tamura, S. et al. : Contribution of adipose tissue and *de novo* lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.*, **115** : 1139-1142, 2005.
- 3) Tamura, Y. et al. : Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90** : 3191-3196, 2005.
- 4) Petersen, K. F. et al. : Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, **350** : 664-671, 2004.
- 5) Pospisilik, J. A. et al. : Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell*, **131** : 476-491, 2007.
- 6) Weisberg, S. P. et al. : Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, **112** : 1796-1808, 2003.
- 7) Maeda, N. et al. : Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.*, **8** : 731-737, 2002.
- 8) Lutchman, G. et al. : Changes in serum adipokine levels during pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis : relationship to histological improvement. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **4** : 1048-1052, 2006.
- 9) Xu, A. et al. : The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin. Invest.*, **112** : 91-100, 2003.
- 10) Adachi, M. et al. : High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology*, **47** : 677-685, 2008.
- 11) Endo, M. et al. : TNF- $\alpha$  induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **232** : 614-621, 2007.
- 12) Ikejima, K. et al. : The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.*, **33** : 151-154, 2005.
- 13) Belfort, R. et al. : A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.*, **355** : 2297-2307, 2006.

\* \* \*

# 飲酒とメタボリックシンドローム

## Alcohol Consumption and Metabolic Syndrome

Motoh Iwasa 岩佐 元雄

Yoshiyuki Takei 竹井 謙之

(三重大学大学院医学系研究科病態制御医学講座消化器内科学)

E-mail: motoh@clin.medic.mie-u.ac.jp

### Key Words

- メタボリックシンドローム
- アルコール性肝障害
- 内臓脂肪蓄積
- インスリン抵抗性
- TNF- $\alpha$

### Summary

Metabolic syndrome is characterized by abdominal obesity, hypertension, dyslipidemia, and elevated fasting blood glucose and is associated with insulin resistance. Metabolic syndrome is a cluster of risk factors that predisposes individuals to cardiovascular disease and diabetes. Light to moderate alcohol consumption may be associated with lower cardiovascular mortality. On the other hand, excess weight is an independent risk factor for the development of alcoholic cirrhosis, acute alcoholic hepatitis, and steatosis. Obesity may contribute to the development of alcoholic liver disease by generating free radicals, increasing tumor necrosis factor-alpha production, and inducing insulin resistance. The intake of a significant amount of alcohol induces a state of insulin resistance. Several cross-sectional studies have indicated a linear dose-response relationship between alcohol intake and hypertension. These observations have a potentially important value for public health recommendations.



著者プロフィール  
岩佐 元雄

三重大学大学院病態制御医学講座消化器内科学助教

1986年 三重大学医学部卒業, 1992年同大学大学院修了(医学博士), 桑名市民病院内科勤務などを経て, 2002年より現職。

専門は肝疾患に対する栄養療法など。

メタボリックシンドロームとは、過栄養状態や運動不足といった生活習慣を背景に、内臓脂肪蓄積、インスリン抵抗性、高脂血症、高血圧などの動脈硬化性疾患のリスクファクターを併せ持つ状態で、心血管疾患の予防医学として確立された疾患概念である。わが国においてもメタボリックシンドローム診断基準検討委員会が組織され、診断基準が提唱されている(表1)。メタボリックシンドロームの構成要素の

中で内臓脂肪蓄積が主要な役割を担っており、診断基準の必須項目となっている。内臓脂肪蓄積は高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症、高血圧、高血糖を生じ、それぞれが心血管疾患のリスクファクターとなり得る。

一方、生活習慣の一つに飲酒があるが、長期にわたる大量飲酒は脂質、糖、乳酸代謝などの代謝系に著しい影響を及ぼすことから、飲酒習慣はメタボリッ



表1. メタボリックシンドロームの診断基準

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| 内臓脂肪沈着を必須とし、高脂血症、高血圧、高血糖のうち、2項目以上が必要 |  |
| 必須項目                                 | 内臓脂肪蓄積   |
|                                      | 臍周囲径 男性 $\geq 85\text{cm}$<br>女性 $\geq 90\text{cm}$                          |
| 上記に加え、以下の2項目以上                       |  |
|                                      | 高中性脂肪血症 $\geq 150\text{mg/dL}$<br>かつ/または<br>低HDLコレステロール血症 $< 40\text{mg/dL}$ |
|                                      | 高血圧 収縮期 $\geq 130\text{mmHg}$<br>かつ/または<br>拡張期 $\geq 85\text{mmHg}$          |
|                                      | 空腹時高血糖 $\geq 110\text{mg/dL}$  |

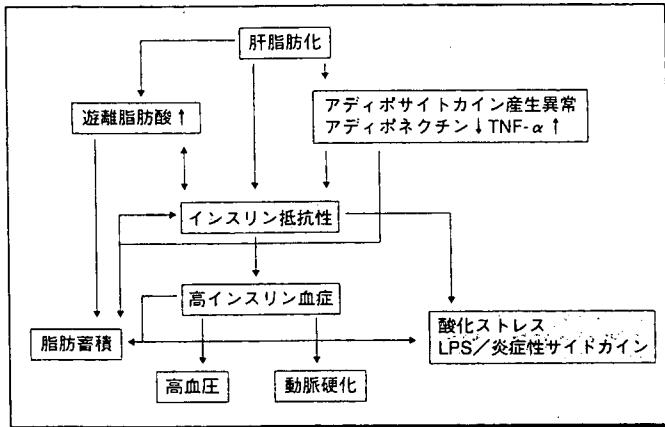


図1. 内臓脂肪の蓄積と脂肪性肝疾患の進展

アルコール性肝障害と肥満あるいは高脂肪食との関連である。肥満はアルコール性脂肪性肝疾患進展におけるリスクファクターであり、Naveauらは1,604例のアルコール性肝疾患患者を対象に肝生検を行い、肥満者（女性：BMI $\geq 25$ ，男性：BMI $\geq 27$ ）は非肥満者と比べ、アルコール性脂肪肝，肝炎，肝硬変にそれぞれ2.5倍，3倍，2.15倍進展しやすいことを明らかにした<sup>1)</sup>。

肥満では高率に脂肪肝がみられ，一部の症例では炎症（脂肪性肝炎）が出現する。脂肪性肝炎は過剰飲酒者で見られるが，近年アルコール性脂肪性肝炎と酷似した病理像を示す非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：NASH）も著増している。肝の脂肪化は，インスリンのシグナル伝達を阻害してインスリン抵抗性を惹起し，代償性に血液中のインスリン濃度上昇を招き，インスリンの負の作用である血圧上昇作用や動脈硬化促進作用が前面に出てくる。さらに内臓脂肪の過剰蓄積は，遊離脂肪酸やTNF- $\alpha$ ，PAI-1などのアディポサイトカインの産生過剰・アンバランスをきたし，インスリン抵抗性惹起や凝固亢進状態形成を介してメタボリックシンドロームの病態形成に深く関与するとともに，肝疾患の進展にも重要な役割を果たしている（図1）。

一方，アルコール性肝障害においては，エタノールが腸管透過性を亢進させ，腸内細菌由来のエンドトキシン（lipopolysaccharide：LPS）が肝在住マクロファージであるクッパー細胞を活性化し，過剰産生された炎症性サ

クシンドロームの促進因子として重要な役割を果たす。また，近年肥満を伴うアルコール性肝障害患者が増加しており，過栄養状態がアルコール性脂肪肝，肝炎，肝硬変の病態進展に強く関与することが明らかにされたことから<sup>1)</sup>，アルコール性肝障害患者の診療において肥満対策が重要な課題となってきた。

本稿では，飲酒がメタボリックシンドロームの構成要素である肥満，脂肪

肝，高脂血症，高血圧，糖尿病に及ぼす影響，および飲酒とメタボリックシンドロームとの関係について概説する。

### 飲酒と肥満，脂肪性肝疾患

アルコール依存症患者は食事をほとんど摂らずに飲酒を続ける例も多く，従来アルコール性肝障害の病態惹起において低栄養の関与が重視されていた。しかし，現在注目されているのは，ア

イトカイン、特にTNF- $\alpha$ や活性酸素種が肝の炎症や線維化を促進させる<sup>2)</sup>。また、慢性エタノール摂取により誘導されるcytochrome p450 2E1は活性酸素種を産生し、肝細胞障害が生じる。TNF- $\alpha$ は、アルコール性肝障害の病態形成に密接に関与するとともに、肝や末梢でのインスリン抵抗性を惹起することが知られる(図2)。

このようにアルコール性、非アルコール性を問わず、脂肪性肝炎の共通の病態として、TNF- $\alpha$ の過剰産生、インスリン抵抗性の惹起、LPSの関与、高酸化ストレス状態があることから、肥満がアルコール性肝障害の促進因子であるとともに、長期間の飲酒はメタボリックシンドローム患者において肝障害の増悪因子であると推定される。また脂肪性肝障害では、過剰蓄積した内臓脂肪のみならず、肝局所からも炎症性サイトカインやPAI-1など線溶阻害因子が活発に産生され、肝障害惹起とともに凝固亢進状況が形成されていると推察される。

### 飲酒と脂質代謝異常

脂質代謝では、アルコール代謝の亢進により、ミトコンドリア内のNADHが過剰となり脂肪酸合成が増加する。また、エタノールは肝のAMP-dependent protein kinaseの活性を低下させるが、これにより脂肪合成系酵素の発現を調節している転写因子sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)の肝内発現が増加し、脂肪酸蓄積(脂肪肝増悪)を

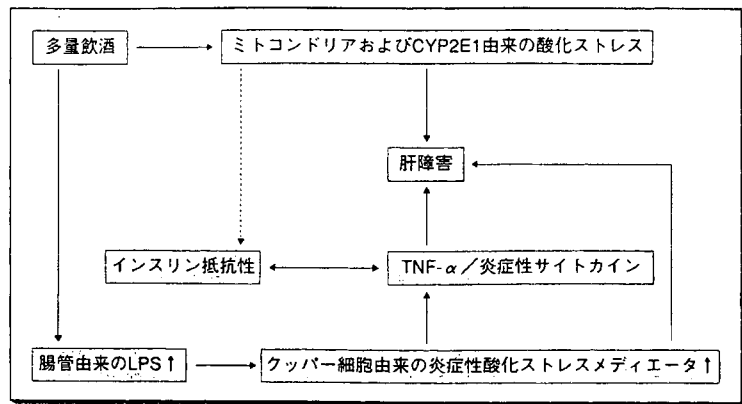


図2. 多量飲酒後の肝障害発症機序

引き起こす。脂肪酸はミトコンドリア内で $\beta$ 酸化されるが、エタノールはこれを抑制することから、過剰になった脂肪酸によりグリセロール3リン酸の合成が促進される。これら脂質合成基質の増加は、肝細胞内での中性脂肪の過剰産生を引き起こし、肝細胞の脂肪化が生じる。また、過剰な脂質は血中にも放出され、中性脂肪や超低比重リポ蛋白分画(VLDL)が著増する。

一方、古くから少量の飲酒がHDLコレステロールを増加させ、動脈硬化の抑制に働くことが知られている。飲酒により血中カイロミクロンが増加し、リポ蛋白リパーゼ(LPL)が活性化されると、トリグリセリドやVLDL合成が亢進し、LPL活性増加はVLDLからHDLへの移行をもたらしてHDLコレステロールが増加すると考えられている。また、少量の飲酒ではLCAT活性が増加することから、HDLコレステロールの合成も促進される。わが国でも、23g/日の飲酒により2.5mg/dLのHDLコレステロール上昇がみられたと報告

されている。

### 飲酒と高血圧、心血管疾患

適量の飲酒により血圧が低下するとされる反面、大酒家に高血圧患者が多いことはよく経験される。わが国の疫学調査では久山町の研究が知られている。これは、40歳以上の正常血圧者1,101名を10年間追跡し、男性では飲酒者で有意に高血圧発症が多く、たとえ23g/日未満の飲酒であっても高血圧発症のリスクとなり得ることを明らかにしている(図3)<sup>3)</sup>。また、Abeらは飲酒習慣のある高血圧患者を対象に、4日間の非飲酒期間と7日間の継続飲酒期間の血圧の変動を検討し、飲酒初日にはアルコールの代謝産物であるアルデヒドの血管拡張作用による一過性の血圧低下が生じるが、飲酒を継続すると深夜や翌朝の血圧が前値より高値となることを報告している<sup>4)</sup>。このように長期間継続した飲酒は高血圧の発症・増悪に密接に関与するとした

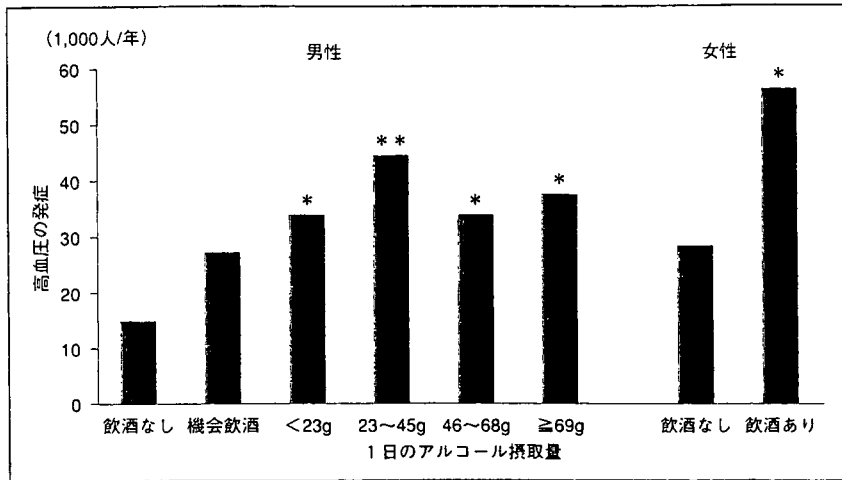


図3. 10年間の観察期間におけるアルコール摂取量と年齢を補正した高血圧発症率との関係  
\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01 vs 非飲酒者

(文献3より引用改変)

報告が多く、これらの知見を踏まえて日本高血圧学会のガイドラインでは、高血圧患者における是正すべき生活習慣として過度の飲酒が示され、男性で20~30g/日以下、女性で10~20g/日以下に制限することが推奨されている。

一方、飲酒と心血管疾患発症に関する研究をみると、少量から中等量の飲酒者は全く飲酒していない人よりも心血管疾患の発症率・死亡率が低いとする報告が多い。その機序として、アルコールにはPGI2の産生亢進やトロンボキサンA2活性抑制による血小板凝集抑制作用や、プラスミノゲンアクチベータ増強による線溶系亢進作用がみられること、前述のように適量飲酒によりHDLが増加することなどがあげられている。高脂肪食摂取にもかかわらず赤ワイン飲酒者では心血管疾患の頻度が少ないとしたフランスでの成績がフレンチ・パラドックスとしてよく

知られているが、これについては赤ワインに含まれるポリフェノールの抗酸化作用により説明されてきた<sup>5)</sup>。しかし、その後のコホート研究により、赤ワインだけではなく他のアルコール飲料でも冠動脈疾患の発症が抑制されることが明らかにされている。最近、38,077名という多数の男性を対象に、飲酒量や飲酒回数ごとに心血管疾患発症のリスクを検討した研究結果が報告されたが、これによると、12年間の経過観察期間に1,418名の心筋梗塞発症があり、50g/日以上飲酒群を含めて飲酒量と心筋梗塞発症には負の相関関係がみられ(図4)<sup>6)</sup>、また、1週間に飲酒する回数が多いほど心筋梗塞発症が少ないことが示された<sup>6)</sup>。以上のように、アルコール摂取により心血管疾患の発症は抑制されるものと考えられる。しかしながら、飲酒量にかかわらず死亡率が低下するわけではなく、

大量飲酒では逆に著しく増加することが多くの研究により明らかにされている<sup>7)</sup>。また、アルコールの許容量には個人差があり、日本人の場合、約半数はアセトアルデヒド脱水素酵素が遺伝的に欠損しているため、欧米での成績がそのまま当てはまらないことに留意する必要がある。

### 飲酒と糖尿病

アルコールにより糖新生系が抑制されるため、空腹状態での過剰飲酒後には低血糖発作が起こることがある。また、アルコールにはインスリンの分泌を促進する作用はないが、少量の飲酒がインスリン抵抗性を改善させるとした成績が示されている。すなわち、10~30g/日の習慣的な飲酒歴のある健常者において、糖負荷後の血中インスリンおよび血糖の上昇が抑えられたこと<sup>8)</sup>、2型糖尿病患者においても40gのアルコール投与後に糖負荷を行い、インスリンや血糖の上昇が抑制されたことなどが報告されている<sup>9)</sup>。このように少量のアルコールにより糖代謝の改善がみられる可能性があるが、現時点でその効果は限定的であると考えられる。臨床的に多量飲酒者に糖尿病合併することはよく経験されることであり、長期的な飲酒は糖尿病の発症因子であり増悪因子である。アルコールには食欲を亢進させる作用があり、アルコール自体1g当たり7kcalのエネルギー源になることと相まって、長期的な飲酒により肥満が助長される。また、長期間の大量飲酒により慢性膵炎が生ず

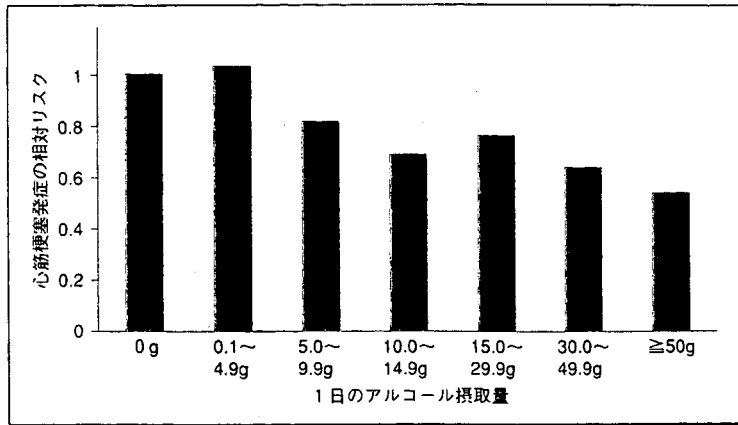


図4. 米国の38,077名の男性アルコール摂取量と年齢, 喫煙で補正した心筋梗塞発症の相対リスク

(文献6より引用改変)

れば, 高率に糖尿病を合併する。実際, わが国の1,075名を対象としたコホート研究でも, 特に男性において飲酒は糖代謝障害発症に寄与する独立した因子であることが明らかにされている<sup>10)</sup>。以上のことから, 糖尿病診療ガイドラインでは, 合併症や肝疾患を有しない血糖コントロール良好例では必ずしも禁酒する必要はないが, それでも1日25g程度を上限として毎日は飲酒させないよう指導することを推奨している。

### 飲酒がメタボリックシンドロームに及ぼす影響

上記のように, 中等量までの飲酒が心血管疾患による死亡を抑制するとした報告が多数みられるが, それでは飲酒はメタボリックシンドロームの発症を低下させるのであろうか。この点に関しては, 現在まで必ずしも意見の一

致をみていない。英国では58歳の391名の男性を対象にアルコール摂取とメタボリックシンドロームの発症との関係が検討されたが, 有意な関係は認められなかった<sup>11)</sup>。米国で8,125名を対象に同様の調査を施行したところ, 軽度および中等度の飲酒ではメタボリックシンドローム発症の相対リスクがそれぞれ0.65, 0.34に低下したと報告されている<sup>12)</sup>。韓国の7,962名を対象にした疫学調査でも, 14.9g/日までの少量の飲酒に限ってメタボリックシンドローム発症の低減効果が報告されている<sup>13)</sup>。しかし, 15g/日以上飲酒群においては, 高血圧や高トリグリセリド血症の発症リスクが高くなり, さらに過度の飲酒(男性 $\geq 80$ g/日, 女性 $\geq 30$ g/日)においてはこれらに加えて腹囲の増加が明らかで, メタボリックシンドロームの基準を満たす症例の増加が示されている。

### おわりに

長期の大量飲酒はさまざまな臓器障害を引き起こすが, 一方で「適正飲酒」は心血管疾患の発症リスクを下げることなど, 飲酒がメタボリックシンドロームの諸要素に与える影響は複雑である。わが国では大量飲酒(問題)飲酒者の数は増えていることを考えると, 適正飲酒を考える上でも, 飲酒とメタボリックシンドロームの関係を明らかにすることは重要であり, 前向きな検討を中心としたより一層の研究の進展が望まれる。

### ●文献

- 1) Naveau S, Giraud V, Borotto E, et al: Excess weight risk for alcoholic liver disease. *Hepatology* 25: 108-111, 1997
- 2) Thurman RG: II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol* 275: G605-611, 1998
- 3) Ohmori S, Kiyohara Y, Kato I, et al: Alcoholic intake and future incidence of hypertension in a general Japanese population: the Hisayama study. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 1010-1016, 2002
- 4) Abe H, Kawano Y, Kojima S, et al: Biphasic effects of repeated alcoholic intake on 24-hour blood pressure in hypertensive patients. *Circulation* 89: 2626-2633, 1994
- 5) Renaud S, de Lorgeril M: Wine alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523-1526, 1992
- 6) Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, et al: Role of drinking pattern and type of alcohol consumed in

- coronary heart disease in men. *N Engl J Med* **348** : 109-118, 2003
- 7) Albert CM, Manson JE, Cook NR, et al : Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation* **100** : 944-950, 1999
- 8) Facchini F, Chen YD, Reaven GM : Light-to moderate alcohol intake is associated with enhanced insulin sensitivity. *Diabetes Care* **17** : 115-119, 1994
- 9) Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Watanabe RM, et al : Acute alcohol consumption improves insulin action without affecting insulin secretion in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* **27** : 1369-1374, 2004
- 10) Kiyohara Y, Shinohara A, Kato I, et al : Dietary factors and development of impaired glucose tolerance and diabetes in a general Japanese population : the Hisayama study. *J Epidemiol* **13** : 251-258, 2003
- 11) Goede D, Fagerberg, Hulthe J : Alcohol consumption, the metabolic syndrome and insulin resistance in 58-year-old clinically healthy men (AIR study). *Clin Sci (Lond)* **102** : 345-452, 2002
- 12) Freiberg MS, Vasan RS, Cabral HJ, et al : Alcohol consumption and the prevalence of the metabolic syndrome in the U.S. *Diabetes Care* **27** : 2954-2959, 2004
- 13) Yoon YS, Oh SW, Baik HW, et al : Alcohol consumption and the metabolic syndrome in Korean adults : the 1998 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* **80** : 217-224, 2004

## Effect of a Herbal Medicine on Fatty Liver in Rats Fed Ethanol Chronically

Yoshinori HORIE<sup>1,2)</sup>, Masahiro KIKUCHI<sup>1,2)</sup>, Yoshiyuki YAMAGISHI<sup>1)</sup>,  
Rumiko UMEDA<sup>1,2)</sup>, Hirotoshi EBINUMA<sup>1)</sup>, Hidetsugu SAITO<sup>1)</sup>, Shinzo KATO<sup>1)</sup>,  
Hiromasa ISHII<sup>1)</sup>, Toshifumi HIBI<sup>1)</sup> and Jing-Yan HAN<sup>3)</sup>

- 1) *Division of Gastroenterology & Hepatology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan*
- 2) *Eiju General Hospital, 2-23-16 Higashiueno Taito-ku, Tokyo 110-8645, Japan*
- 3) *Department of Integration of Chinese & Western Medicine, School of Basic Medical Science, Beijing University, and Tasly Microcirculation Research Center, Peking University Health Science Center, No.38 Xueyuan Road, Haidian District, Beijing 100083, China*

(Received : July 22, 2009 ; Accepted : October 16, 2009)

### Summary

**Aim:** The objective of this study was to determine whether Cardiotopic Pills (CP) affects fatty liver in rats fed ethanol chronically.

**Materials and methods:** Male Wistar rats were treated with liquid diet that contained ethanol (36% of total calories) or an isocaloric carbohydrate instead of ethanol for 6 weeks. CP, an oral herbal medicine including Danshen (*Salviae Miltiorrhiza*), Panax notoginseny and *Dyroblanops aromatica gaertn.*, have been clinically used for vascular diseases such as coronary diseases and cerebral infarction. CP was administered orally with the liquid diets for 2 weeks 0.4 mg/kg body weight/day with the liquid diet thereafter. Serum triglyceride and total cholesterol levels, total protein, albumin, and AST and ALT activities are measured. Histological examination was also carried out. In another set of experiments, autofluorescence of NAD(P)H, an indicator of mitochondrial O<sub>2</sub> consumption and redox status, was measured by an intravital microscopy, and peroxisome proliferators-activated receptor- (PPAR)- $\alpha$  and  $\gamma$  mRNA levels were evaluated by real time quantitative PCR methods.

**Results:** Chronic ethanol consumption elevated serum triglyceride level, and caused fatty degeneration of liver. After administration of CP, fatty degeneration was not observed in rats fed ethanol chronically. Elevation of serum triglyceride level was not noted after treatment with CP (Ethanol: 79.4  $\pm$  9.3 mg/dl, Ethanol+CP: 48.0  $\pm$  4.4, respectively,  $p < 0.05$ ). CP did not affect any other laboratory data or NAD(P)H levels. Chronic ethanol consumption did not affect PPAR- $\gamma$  mRNA levels, while it decreased PPAR- $\alpha$  mRNA levels in the liver. CP prevented the ethanol-induced decrease in PPAR- $\alpha$  mRNA levels. CP and its components could enhance

expression of PPAR- $\alpha$  mRNA levels.

**Conclusion:** These results suggest that CP may be useful to prevent alcoholic fatty liver via enhanced expression of PPAR- $\alpha$ .

**Key words:** alcohol, fatty liver, peroxisome proliferators-activated receptor- (PPAR)- $\alpha$ , herbal medicine, hyperlipidemia

## Introduction

Alcohol-induced liver injury is the most common liver disease in which fatty acid metabolism is deranged. Recently, incidence of alcoholic liver disease (ALD) has been increasing in Japan associated with an increase in alcoholic beverage consumption<sup>1,2</sup>. Excess amount of ethanol is one of the major factors for fatty liver as well as excess nutrition and diabetes. It is recognized that fatty liver and hyperlipidemia are common in chronic alcoholics. Although many investigators demonstrated ethanol affected lipid or lipoprotein metabolism, there are only few practical approaches to prevent alcoholic fatty liver. Excess amount of ethanol causes an increase in NADH/NAD ratio during its metabolism in the cytosol by alcohol and aldehyde dehydrogenases (ADH and ALDH), which leads to reduction of  $\beta$ -oxidation in mitochondria and subsequent fatty degeneration in the liver. This in turn leads to severe free fatty acid (FFA) overload, increased synthesis of triacylglycerol, and steatosis, despite elevated rates of very low density lipoprotein synthesis and secretion<sup>3,4</sup>. Although fatty liver was thought in the past to be relatively benign, recent studies have demonstrated that accumulation of fat in the liver in response to chronic alcohol consumption can lead to more severe forms of liver injury, namely hepatitis, liver fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma<sup>1,2,5,6</sup>. Abstinence from alcohol is the long-term goal of management of all forms of alcoholic liver disease, and most cases can be cured by abstinence of alcoholic beverages or a decrease in ethanol intake. However, some of them cannot stop or decrease drinking, even if they are not alcoholics. Development of specific pharmacological agents to reverse steatosis is at an early stage, and there is no established therapy for alcoholic fatty liver.

Recently, several mechanisms involved in the development of alcoholic fatty liver have emerged, providing important therapeutic leads. Chronic ethanol administration in mice is associated with inhibition of AMP-activated protein kinase (AMPK) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$ , two critical signaling molecules controlling the pathways of hepatic fatty acid oxidation<sup>7-10</sup>. PPAR- $\alpha$ , a member of the nuclear hormone receptor superfamily, is a key transcriptional regulator of many genes involved in free fatty acid oxidation system in the liver<sup>11</sup>. Fasted PPAR- $\alpha$  null mice suffer from a severe impairment in hepatic FFA oxidation, resulting in a phenotype characterized by hypoglycemia, hypothermia, hypoketonemia, elevated plasma levels of FFAs, and fatty liver<sup>12</sup>. Recent observations<sup>12-15</sup> point out the critical importance of PPAR- $\alpha$  in determining the severity of hepatic steatosis in animals fed a high fat diet<sup>12</sup>.

Herbal medicines (traditional medicines from natural sources) are recently attracting

increased global attention. Furthermore, Chinese herbal medicines have stood the test of time and many are widely accepted as having reliable therapeutic efficacy. Cardiotopic Pills (CP), an oral herbal medicine including Danshen (*Salviae Miltiorrhiza*), Panax notoginseny and *Dyroblanops aromatica gaertn*, have been clinically used in China, Korea and Russia for vascular diseases such as occlusive vasculitis, coronary diseases, atherosclerosis, and cerebral infarction, which are related to microvascular dysfunction<sup>16-18</sup>. In clinical cases, the main component, Danshen, has been reported to have curative efficacy in ischemic cerebrovascular disease. In animal models, Danshen has been reported to prevent cerebral and intestinal reperfusion injury<sup>17,18</sup>. In the rat cerebral ischemia model, Danshen was reported to improve cerebral blood flow in the ischemic hemisphere and to inhibit platelet aggregation in rats<sup>17</sup>. We have recently reported that CP prevents gut ischemia/reperfusion-induced liver injury via inhibition of oxidative stress<sup>16</sup>. *Salvia Mltiorrhiza*, main component of CP, has been shown to inhibit low density lipoproteins oxidation and reduce atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits<sup>19</sup>. However, little is known about an effect of CP on fat infiltration in the liver. The objective of this study was to determine whether CP affects fatty liver in rats induced by chronic alcohol feeding.

## Materials and Methods

### Chronic ethanol consumption model

Forty (20 pairs) male Wistar rats weighing about 150 g were pair-fed for 6 weeks with a liquid diet containing ethanol that provided 36 % of the total dietary calories or an isocaloric control diet according to the method of Lieber and DeCarli<sup>20</sup>. CP (Tasley, Tianjin, China) was administered orally with the liquid diets for 2 weeks 0.4 mg/kg body weight/day with the liquid diet thereafter. Twenty-five mg (one pill) of CP includes 9 mg of Danshen (*Salviae Miltiorrhizae*), 1.76 mg of Panax notoginseny, 0.5 mg of *Dyroblanops aromatica gaertn*, and 13.74 mg of polyethylene glycol. All rats were fasted 18 hours prior to the experiment. All experiments were performed according to the criteria outlined in the US National Research Council Guide.

Serum triglyceride and total cholesterol levels, total protein, albumin, and AST and ALT activities are measured. Histological examination was also carried out. Blood samples for triglyceride (TG), total cholesterol (TC), total protein, (TP), albumin (Alb), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) were collected from the inferior vena cava at a point proximal to the hepatic vein. Their concentrations (or activities) were measured with a standard clinical autoanalyzer (Hitachi 7170; Hitachi Ltd., Tokyo Japan) as previously described<sup>21</sup>. Plasma tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  concentration was determined in a microtiter plate using a TNF- $\alpha$  immunoassay kit (BioSource International, Camarillo, CA) based on enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). PPAR- $\alpha$  and  $\gamma$  mRNA levels in the liver was measured by quantitative real time RT-PCR method with ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo Japan) according to the method of Chomczynski and Sacchi<sup>22</sup>. The TaqMan probes and primers for rat PPAR- $\alpha$  (assay identification number Rn00566193\_m1), and rat PPAR- $\gamma$



(assay identification number Rn00440945\_m1) were assay-on-demand gene expression products (Applied Biosystems). Human GAPDH gene was used as endogenous control (Applied Biosystems, catalog number 4326317E).

### Acute ethanol, CP and its components administration model

In another set of experiments, autofluorescence of NAD(P)H, an indicator of mitochondrial redox status, was measured by an intravital microscopy. After male Wistar rats weighing about 250 g were anesthetized with pentobarbital sodium (35 mg/kg) intraperitoneally, 4g/kg of ethanol (40%) was administered intragastrically through a gastric tube. Autofluorescence of NAD(P)H was measured at 0, 15, and 30 min after the administration of ethanol. In some experiments, CP (0.4 mg/kg body weight) was administered with ethanol. Plasma ethanol concentration was measured with gas chromatograph (Perkin-Elmer, Yokohama, Japan), according to a previous report<sup>23</sup>.

In another set of experiments, CP (0.4g/kg/day), Danshen (*Salviae Miltiorrhiza*) (0.04g/kg/day), or *Panax notoginseny* (0.04g/kg/day) were administered intragastrically through a gastric tube for 3 days. The liver was collected 2 hr after the final administration of agents. PPAR- $\alpha$  and  $\gamma$  mRNA levels in the liver was evaluated by quantitative real time RT-PCR method described above.

### Analysis of autofluorescence of pyridine nucleotide using an intravital microscopy

Rats were anesthetized with pentobarbital sodium (35 mg/kg) intraperitoneally. The left jugular vein was cannulated for drug administration. After laparotomy, a lobe of the liver was observed with an inverted intravital microscope (TMD-2S, Diaphoto, Nikon, Tokyo, Japan) assisted by a silicon intensified target (SIT) camera (C-2400-08, Hamamatsu Photonicus, Shizuoka, Japan). The liver was placed on an adjustable Plexiglas microscope stage with a nonfluorescent coverslip that allowed for observation of a 2-cm<sup>2</sup> segment of tissue. The liver was carefully placed to minimize the influence of respiratory movements, and the surface was moistened and covered with cotton gauze soaked with saline. Images of the microcirculation were observed from the surface of the liver through a x20 fluorescent objective, and microfluorographs were recorded on videotape using a videocassette recorder (S VHS-HQ, Victor, Japan). Autofluorescence of NAD(P)H, as an indicator of mitochondrial O<sub>2</sub> consumption and redox status<sup>21,24-26</sup>, was measured using the same intravital microscopy system, according to the previous study<sup>26</sup>.

### Statistical analysis

The data were analyzed using standard statistical analyses, i.e., ANOVA. All values were reported as mean  $\pm$  SD, with five rats per group. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

Table 1 shows the effects of chronic ethanol consumption and/or CP treatment on body

Table 1 Effect of cardiogenic pills on plasma biomedical parameters in control and ethanol-fed rats.

|            | BW<br>(g)     | TG<br>(mg/dl)               | TC<br>(mg/dl)  | TP<br>(g/dl)    | ALB<br>(g/dl)   | AST<br>(IU/l)   | ALT<br>(IU/l)  | TNF- $\alpha$<br>(pg/ml)    |
|------------|---------------|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| Control    | 334 $\pm$ 4.0 | 58.8 $\pm$ 5.7              | 84.0 $\pm$ 1.6 | 5.10 $\pm$ 0.20 | 3.86 $\pm$ 0.13 | 123.4 $\pm$ 4.0 | 33.6 $\pm$ 4.8 | 11.1 $\pm$ 2.1              |
| Ethanol    | 316 $\pm$ 4.0 | 79.4 $\pm$ 9.3 <sup>a</sup> | 92.6 $\pm$ 6.8 | 4.80 $\pm$ 0.13 | 3.58 $\pm$ 0.10 | 136.6 $\pm$ 5.2 | 39.4 $\pm$ 5.5 | 23.0 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup> |
| Control+CP | 330 $\pm$ 5.4 | 43.8 $\pm$ 4.2              | 73.2 $\pm$ 3.9 | 5.00 $\pm$ 0.07 | 3.88 $\pm$ 0.07 | 120.8 $\pm$ 4.8 | 35.0 $\pm$ 3.2 | 11.0 $\pm$ 2.4              |
| Ethanol+CP | 324 $\pm$ 6.0 | 48.0 $\pm$ 4.0              | 81.0 $\pm$ 1.8 | 5.14 $\pm$ 0.13 | 3.88 $\pm$ 0.13 | 147.2 $\pm$ 5.8 | 35.8 $\pm$ 4.8 | 13.2 $\pm$ 2.9              |

CP: cardiogenic pills, <sup>a</sup>p<0.05 vs Control

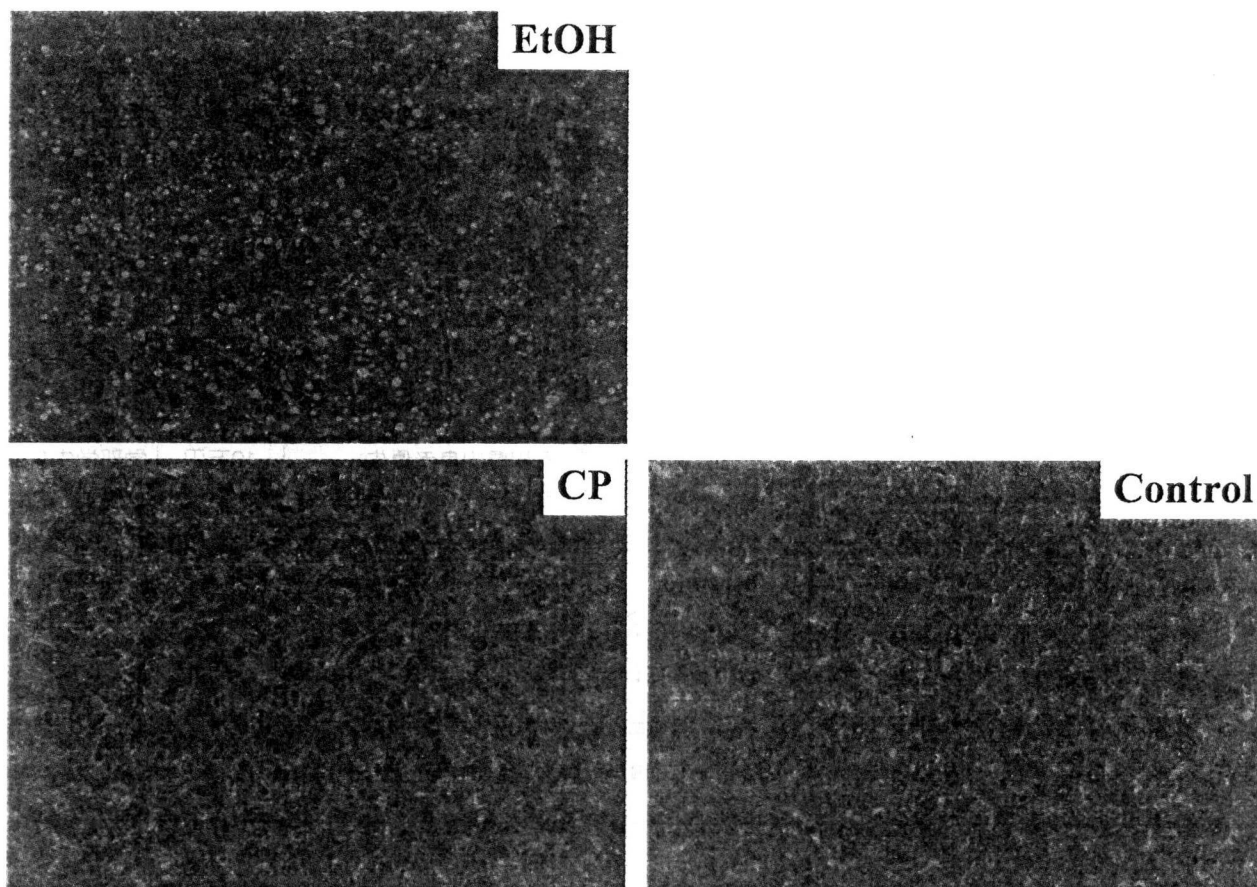


Fig.1 Effect of CP on chronic ethanol feeding-induced fat infiltration in the liver. (HE, 40x10)

Chronic ethanol consumption caused fatty degeneration of liver. After administration of CP, fatty degeneration was not observed in rats fed ethanol chronically.

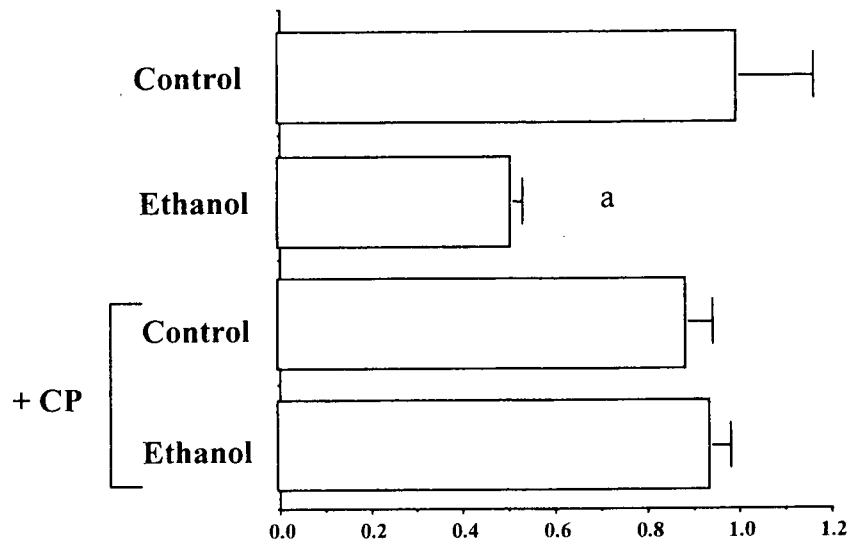


Fig.2 Effects of chronic ethanol consumption and/or CP treatment on PPAR- $\alpha$  mRNA level in the liver.

Chronic ethanol consumption decreased expression of PPAR- $\alpha$  mRNA level. The decrease in PPAR- $\alpha$  mRNA level was not noted after treatment with CP. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs Control

weight, serum levels of TG, TC, TP, Alb, activities of AST and ALT and plasma TNF- $\alpha$  levels in control (chow fed) and pair-fed rats. Chronic ethanol consumption elevated serum triglyceride level. Elevation of serum triglyceride level was not noted after treatment with CP (Ethanol:  $79.4 \pm 9.3$  mg/dl, Ethanol + CP:  $48.0 \pm 4.4$ , respectively). Chronic ethanol feeding per se caused elevation of plasma TNF- $\alpha$  levels, while CP diminished it. CP did not affect any other nutritional parameters or laboratory data.

Chronic ethanol consumption caused fatty degeneration of liver (Figure 1). After administration of CP, fatty degeneration was not observed in rats fed ethanol chronically.

Figure 2 illustrates the effects of chronic ethanol consumption and/or CP treatment on PPAR- $\alpha$  and - $\gamma$  mRNA level in the liver. Chronic ethanol consumption decreased expression of PPAR- $\alpha$  mRNA level. The decrease in PPAR- $\alpha$  mRNA level was not noted after treatment with CP. Neither Chronic ethanol consumption nor CP did affect PPAR- $\gamma$  mRNA level.

Figure 3 illustrates the effects of acute administration of CP and its components on PPAR- $\alpha$  (panel A) and - $\gamma$  (panel B) mRNA level in the liver of control (chow fed) and pair-fed rats. Acute administration of CP and its components enhanced expression of PPAR- $\alpha$  mRNA level both in control (chow fed) and pair-fed rats. Neither acute administration of CP nor its components did enhance expression of PPAR- $\gamma$  mRNA level in control (chow fed) or pair-fed rats.

Acute ethanol administration increased NADH autofluorescence in the liver, while CP did not affect the ethanol-induced increase in NADH autofluorescence in the liver (Figure 4).

Plasma ethanol concentration was  $36.4 \pm 1.7$  mM at 45 min after intragastric acute ethanol administration of ethanol. Acute CP administration did not affect plasma ethanol concentration ( $35.8 \pm 2.0$  mM).

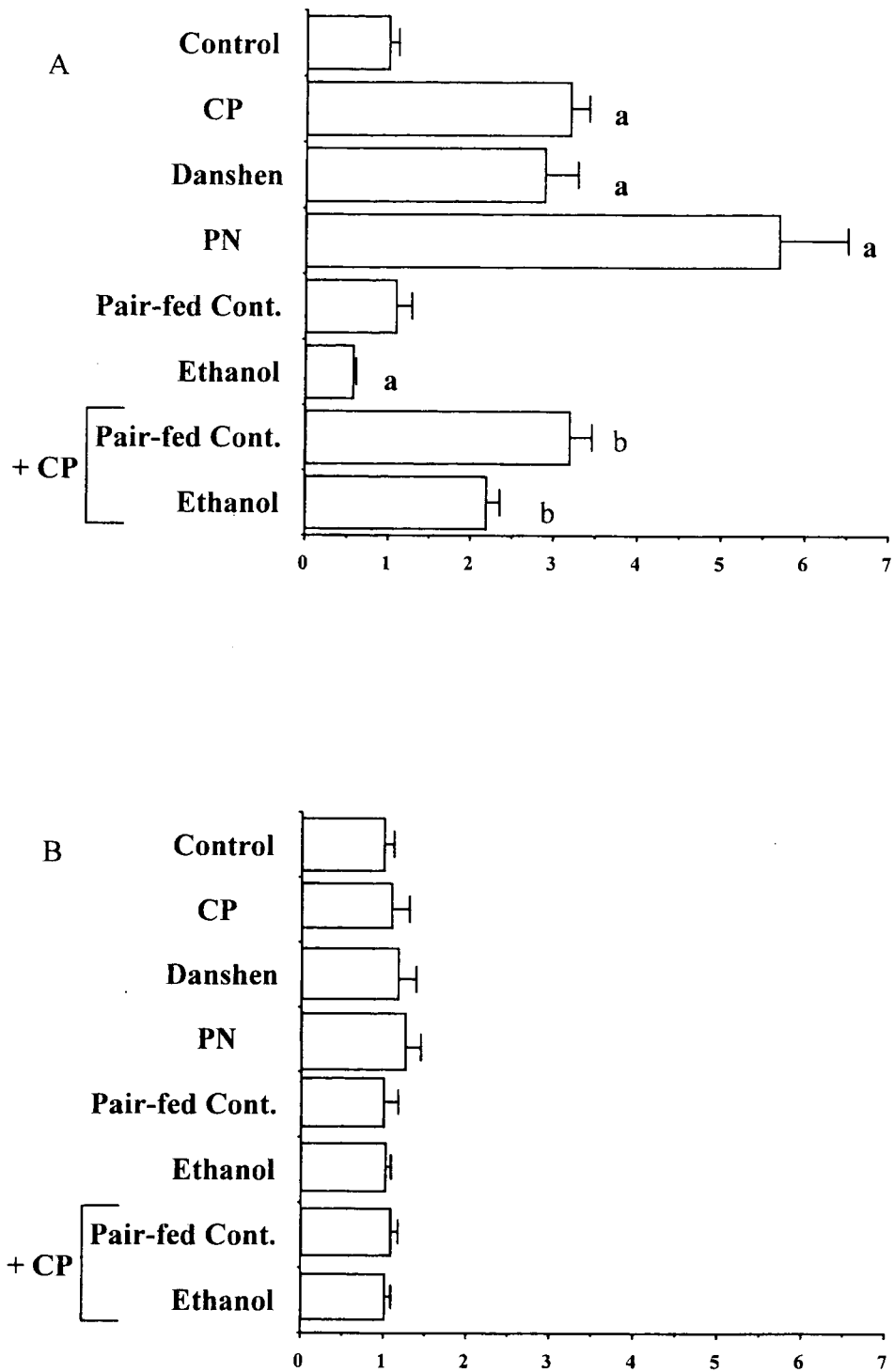


Fig.3 Effects of acute administration of CP and its components on PPAR- $\alpha$  (panel A) and - $\gamma$  (panel B) mRNA level in the liver of control (chow fed) and pair-fed rats. Acute administration of CP and its components enhanced expression of PPAR- $\alpha$  mRNA level both in control (chow fed) and pair-fed rats. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs Control, <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs Ethanol