

C57BL/6 마우스에서 알코올성 간 독성에 대한 DSF의 효과

경희대학교 의과대학 의동물학교실, 한양대학교 의과대학 약리학교실¹,
병리학교실², 의생명과학연구원³, 연변대학교 약과대학 약학과⁴

이윤식 · Hai-Dan Yuan^{1,4} · 최원형 · 유재영 · Meihua Jiang
Yujing Mi · Han-Hong Xiu² · 박진희^{1,3} · 박유신^{1,3} · 강주섭^{1,3}

The Effect of DSF on the EtOH-induced Hepatotoxicity in C57BL/6 Mice

Yun-Sik Lee, Hai-Dan Yuan^{1,4}, Won Hyoung Choi, Jae Young Yoo, Meihua Jiang,
Yujing Mi, Han-Hong Xiu², Jin-Hee Park^{1,3}, Yoo-Sin Park^{1,3} and Ju-Seop Kang^{1,3}

Department of Medical Zoology, College of Medicine Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea,
Departments of ¹Pharmacology, ²Pathology, College of Medicine, ³Institute of Biomedical Science,
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, ⁴Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy,
Yianbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

The aim of this study was to investigate the effect of disulfiram (tetraethylthiuram disulfide, DSF) on the alcoholic liver diseases in mice. C57BL/6 mice were divided into five groups. Control (normal), ethanol treated, DSF treated, ethanol and DSF treated, DSF treated after ethanol treatment for 3 weeks. We evaluated mice body weight and liver weight. On 1 week, body weight was decreased in ethanol treated mice and the body weight gain was similar in all groups of mice after 2 week. With interests, the body weight was significantly increased after treatment of ethanol and DSF for 3 week. However, in the mice with the treatment of DSF only, there was no change of body weight gain and was similar with that of control group of mice. The liver weight of ethanol treated groups was significantly higher than the other groups. A level of ALT, AST and cholesterol in serum were increased in the ethanol treated mice and the level of cholesterol and LDH were increased in DSF treated mice. By H&E staining, we observed degenerative liver tissue change; periportal lymphocytic infiltration, hepatocytes necrosis, severe inflammatory cell infiltrations in ethanol group, and the liver damage was slightly recovered by the treatment of DSF. These results suggest that drinking ethanol is inducible mouse liver damage and the ethanol-induced liver damage was recovered by the treatment of DSF. (*Cancer Prev Res* 13, 222-227, 2008)

Key Words: DSF, Ethanol, Hepatotoxicity, Mice liver

서 론

알코올성 간질환(Alcoholic liver disease, ALD)은 세계적으로 광범위한 질환 중에 하나이다.¹⁾ 간은 알코올을 분해할 수 있는 유일한 신체 내 장기이다. 알코올을 섭취

후, 위장과 소장에서 80~90% 이상 빠르게 흡수된 알코올은 간에서 산화되어 acetaldehyde 와 acetate가 분해산물로 생성된다.^{2,3)} 알코올을 분해하도록 간장에서 분비되는 효소의 시스템은 alcohol dehydrogenase (ADH), aldehyde dehydrogenase (ALDH), 그리고 microsomal ethanoloxidizing system (MEOS)의 세가지로 구성되어있다.⁴⁾ 흡수된 에탄

책임저자 : 강주섭, ☎ 133-791, 서울시 성동구 행당동 17
한양대학교 의과대학 약리학교실(제1의학관 3F)
Tel: 02-2220-0652, Fax: 02-2292-6686
E-mail: jskang@hanyang.ac.kr
접수일 : 2008년 9월 1일, 게재승인일 : 2008년 9월 16일

Correspondence to : Ju-Seop Kang
Department of Pharmacology, College of Medicine, Hanyang University,
17, Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea
Tel: +82-2-2220-0652; Fax: +82-2-2292-6686
E-mail: jskang@hanyang.ac.kr

올은 cytosolic ADH의 촉매작용에 의해 acetaldehyde로 대사되며, 이것은 ALDH에 의하여 acetate로 산화된다.^{4,6)} 이러한 산화반응은 NADH와 NAD의 작용과 세포의 산화환원 상태로 유도되는 복합적인 작용이 관련되어 있다.⁷⁾ 에탄올의 산화과정에 있어서 NAD⁺/NADH가 유의하게 증가하며, 지방산의 억제와 TCA 회로에 의하여 지방형성이 자극된다.⁸⁾ 간에서 알코올을 분해하며 가장 먼저 생성되는 물질인 acetaldehyde는 간 독성에 주된 물질이다.⁵⁾ Acetaldehyde는 지질 과산화작용에 의한 aldehydic 산물은 안정 또는 불안정한 형태의 단백질에 반응되어 기능 이상을 초래할 수 있기 때문에 에탄올 자체에 비하여 더 유독하다.⁹⁾ 장기간의 알코올섭취(중독성 알코올섭취)는 간조직의 손상에 따른 변화 혹은 간세포의 섬유화(hepatofibrosis)나 간경화(liver cirrhosis)를 초래하게 된다.¹⁰⁻¹²⁾ DSF은 알코올 중독 치료제로 60년 가까이 사용되어 온 약물이다.¹³⁾ 알코올 대사에 반응하고, 혈중 acetaldehyde의 수준을 증가시켜 aldehyde dehydrogenase의 억제제로 알려져 있다.^{14,15)} 본 연구는 C57BL/6 마우스의 알코올성 초기 간 경변에 있어서 DSF 약물의 효과를 검증하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. Animals

공시동물은 5 주령의 C57BL/6 수컷 마우스(18~20 g, Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan)를 선정하였으며, (주)한국중앙실험동물에서(Korea Jung-Ang Lab Animal Co. Seoul, Korea). 본 실험을 실시하기 전에 1주일간 사육하여 적응시켰다. 공시동물의 사육환경은 18±2°C 온도와 50±10%의 습도, 그리고 낮과 밤의 주기를 각각 12시간씩 자동조절 하여주었다. 사료와 음수의 급여는 제한하지 않고 자유롭게 섭취하도록 하였다. 체중의 측정은 실험기간 중 1주일에 한번씩 계속하여 측정하였다. 한양대학교에서 제공되고 있는 관리 규정에 의하여 공시동물의 관리를 시행하였다.

2. Experimental groups

29마리의 공시동물을 무작위를 선정하여 5개의 그룹으로 나누었다. Group I (normal group, n=5)은 정상적인 상태를 유지하기 위하여 1일 2회 0.1 ml의 생리식염수만을 물과 함께 공급하거나 복강(i.p)에 주사하였다. Group II (DSF group, n=6)는 지속적인 음수의 투여와 함께, 아침에 DSF를 1 mg/kg/day의 수준으로 복강 내에 주사하였으며, 저녁에는 0.1 ml의 생리식염수만을 복강에 주사하

였다. Group III (Model group, n=6)은 20% 에탄올을 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 15% 에탄올 0.1 ml을 1일 2회 복강에 주사하였다. Group IV (n=5)는 20% 에탄올을 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 아침에 DSF를 1 mg/kg/day의 수준으로 복강 내에 주사하였으며, 저녁에는 15% 에탄올 0.1 ml을 복강에 주사하였다. Group V (n=7)는 20% 에탄올을 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 시험 첫 3주간에는 15% 에탄올 0.1 ml을 1일 2회 복강에 주사하였고, 그 이후에는 아침에 DSF를 1 mg/kg/day의 수준으로 복강 내에 주사하였으며, 저녁에는 15% 에탄올 0.1 ml을 복강에 주사하였다. 마우스의 실험기간은 모두 6주가 소요되었다. 섭취용 에탄올은 증류수에 20 v/v%의 비율로 희석하여 사용하였다.¹⁶⁾ 복강에 주사하기 위한 에탄올은 0.9% NaCl에 15%[v/v]으로 희석하여 사용하였다.¹⁷⁾ DSF의 사용도 0.9% NaCl에 희석하여 사용하였다.

3. Liver tissue and blood collection

마우스를 도살하기 전에 진정제인 pentobarbital을 30 mg/kg을 사용하여 마취시켰다. 전혈(whole blood)의 채취는 심장에 주사기를 삽입하여 채혈한 후 EDTA가 첨가되어 있는 튜브에 넣었다. 채취된 혈액은 2,500×g의 속도로 4°C에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 실험 시까지 동결 보관하였다. 마우스에서 간을 수집한 후, 중량을 측정하였으며, 10% formalin solution으로 세포를 고정하여 조직학적 분석 시까지 보관하였다.

4. Chemical assays for serum levels of ALT, AST, CHOL, LDH

혈액 중 aspartate aminotransferase (AST)와 cholesterol (CHOL) 함량의 분석은 AU400 clinical autoanalyzer (Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 혈액 중 alanine aminotransferase (ALT)와 lactate dehydrogenase (LDH)의 분석은 HBi (HBI Co, Ltd. Korea)의 spectrophotometric kit를 사용하여 분광광도계로 측정하여 분석하였다.

5. Hepatic Histological Examinations

포르말린 용액에 의하여 고정된 간 조직은 기본 실험 방법 및 조직 절편으로 만든 후 파라핀으로 포매하고, hematoxylin과 eosin으로 염색하고 형태학적 변화의 차이를 관찰하였다.

6. Statistical analysis

통계분석은 SPSS (Ver. 14.0) 프로그램을 이용하여 분석

하였다. 데이터는 평균 및 표준편차를 구하였으며, 분산 분석(ANOVA) 및 Duncan's multiple range test법을 이용하여 사후검정 및 통계검정을 실시하여 집단 간의 차이를 분석하였다.

결 과

1. Effects of ethanol and DSF on change of body weight gain in mice

Fig. 1은 실험이 시작부터 종료까지 1주일 간격으로 측정된 마우스 체중의 변화를 나타낸 것이다. 실험시작 후 1주일 경과하였을 때 에탄올을 처리한 그룹에서 체중의 감소가 나타났다. 그러나 2주 후에는 모든 그룹에서 체중의 증가가 이루어졌다. 3주 후에는 에탄올과 DSF를 처리한 집단에서 증가하는 경향을 보여주었다. 그러나 DSF만을 첨가한 그룹에서는 정상 집단(Control group)과 유사한 체중 변화를 보여주었다.

2. Mice liver weight

간(liver)의 무게는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 에탄올을

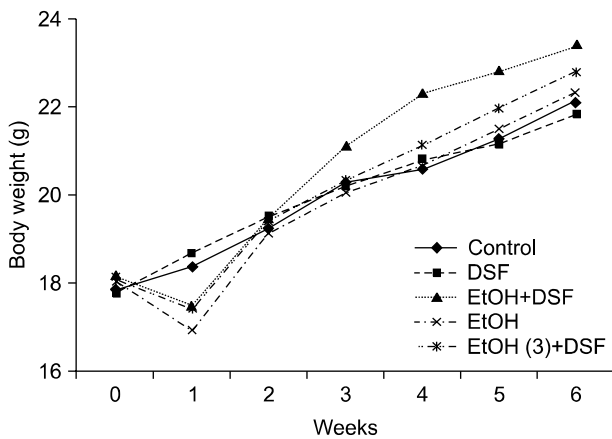


Fig. 1. Effect of ethanol and DSF on changes of body weight gain in C57BL/6 mice. Experimental mice (n=6 or 7/ group) were allowed to freely access to drinking water containing in 20% ethanol, ethanol were injected twice in a day for first 3 weeks with *ip*. Following ethanol treatment for three weeks, 1 mg/kg of DSF, 0.1 ml 15%[v/v] ethanol and 0.9%[v/v] saline were injected twice in a day for following 3 weeks with *ip*, respectively. The diet and water were provided to the animals *ad libitum*. Body weights were measured once per week throughout experiment. Each graph was shown as following: ◆, control; ■, DSF; ▲, ethanol and DSF treated simultaneously; x, ethanol; *, ethanol treated for 3 weeks before DSF treatment, then ethanol and DSF treated simultaneously for 6 weeks.

처리한 집단에서 다른 집단에 비하여 유의하게 무거웠다($p < 0.05$).

3. The serum level of parameters in ethanol-induced hepatotoxicity mice

혈액에 간독성을 나타내는 혈액 생화학적인 지표로서 아미노 전이효소인 AST, ALT, LDH를 분석한다. 이러한 전이효소들은 간세포 내에 여러 가지의 형태로 존재하고 있으며, 특히 ALT의 농도 증가는 간 질환의 심각성에 대한 지표로서 선택되고 있다. 본 연구에서 간세포의 손상에 원인이 되는 에탄올과 DSF의 효과에 대해 분석하고자 ALT, AST, CHOL, 그리고 LDH를 분석한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. ALT, AST, 그리고 CHOL 수준은 에탄올을 처리한 집단에서 유의하게 증가되었다. CHOL과 LDH의 경우에는 DSF 집단에서만 유의하게 증가되었다.

4. Histological pathology of the liver tissue

조직학적인 방법을 통해 간조직을 분석한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 정상 집단과 DSF 집단의 마우스에서 간세포 조직과 간 중심정맥에서 유사한 형태로 손상이나 간병변이 없는 것으로 나타났다(Fig. 3A, 3B). Fig. 3의 C에서 보여 주는 것처럼 ethanol을 처리한 마우스의 그룹의 간 조직에서는 간문맥 주위의 림프구의 침투, 간조직 괴사, 약한 정도의 복합적 염증 발생 등의 매우 심

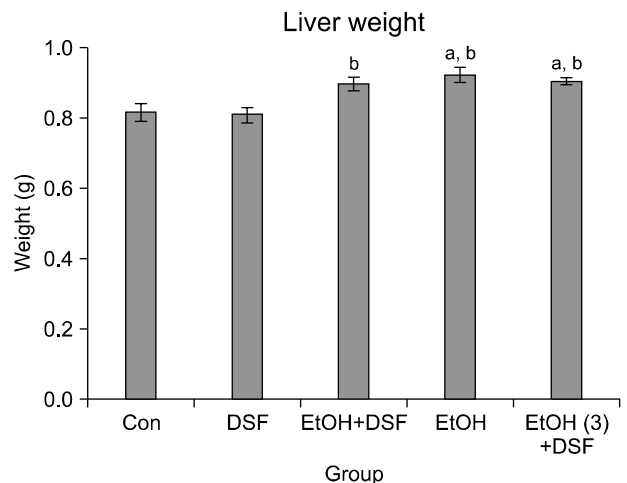


Fig. 2. Effect of ethanol and DSF on change of liver weight in C57BL/6 mice. Data are presented as the Means±SD. ^a $p < 0.05$ compared to control groups, ^b $p < 0.05$ compared to DSF groups. Statistical differences between groups were performed by ANOVA one way test followed by Duncan's multiple range test.

Table 1. Serum level of ALT, AST, CHOL, LDH in experimental mice

Groups	ALT (U/L)	AST (U/L)	CHOL (mg/dl)	LDH (U/L)
Con (n=5)	17.20±0.86	96.36±3.04	43.00±3.51	913.20±14.28
DSF (n=6)	22.33±0.84	113.45±4.95	99.95±11.44*	1035.17±15.13*
EtOH (n=6)	24.33±0.67*	133.77±4.20*	82.85±16.42*	924.50±14.34
EtOH+DSF (n=5)	17.40±1.94	110.24±3.20	92.58±4.45*	1043.00±27.02*
EtOH (3)+DSF (n=7)	19.43±1.32	121.13±6.41*	89.54±10.63*	943.14±16.52

Data are presented as the Means±SD. * $p < 0.05$ compared to control groups, Statistical difference between groups were performed by ANOVA one way test followed by Duncan's multiple range test.

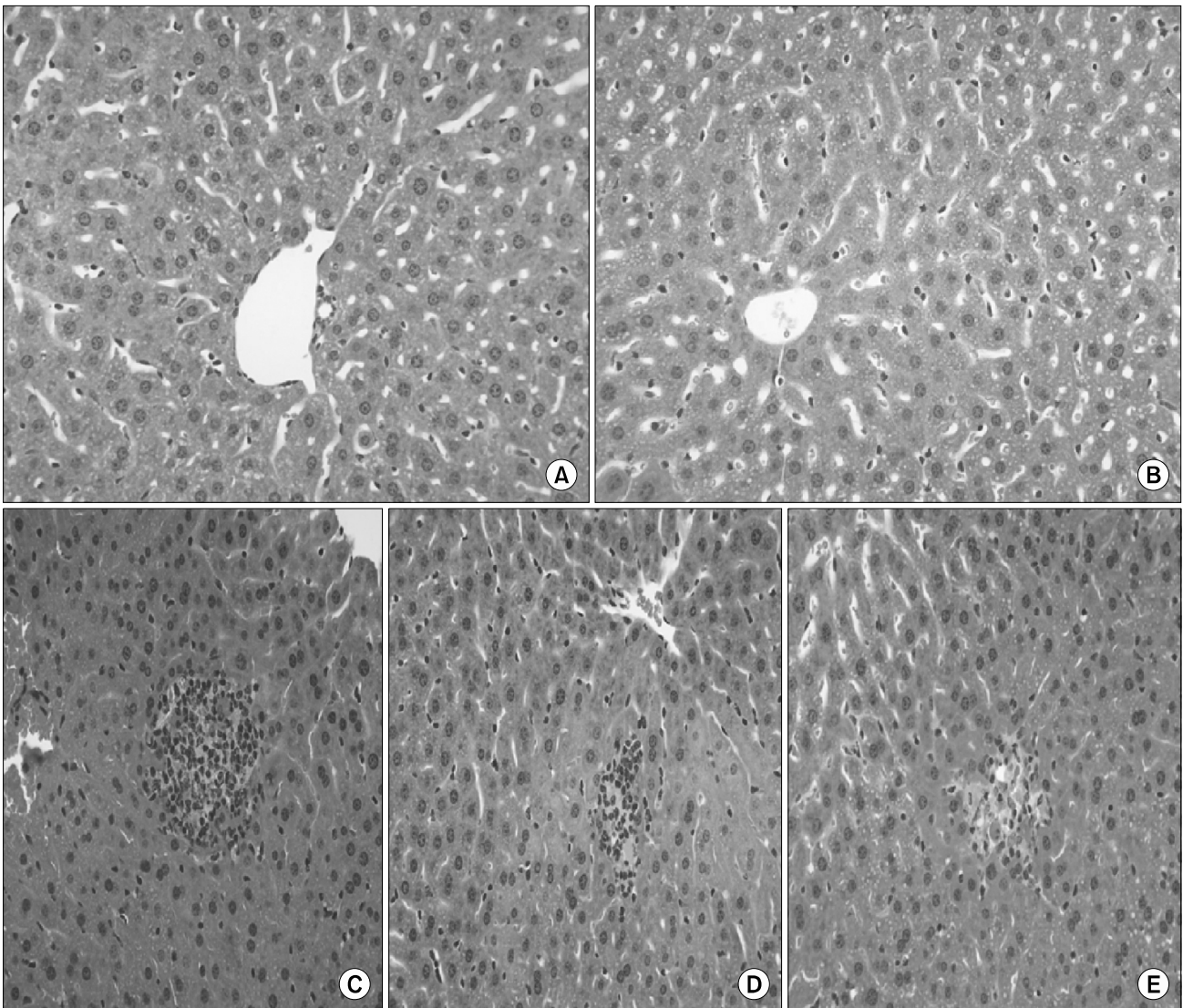


Fig. 3. Effect of DSF on hepatopathology of hepatocytes after ethanol-induced hepatotoxicity in mice. Histopathological changes were analysed the liver tissues from different treated groups; Control mice (A), DSF mice (B), Ethanol mice (C), Ethanol+DSF mice (D), Ethanol (3 week)+DSF mice (E), The experimental data was shown the represent data from 5 individual mouse in each group. H&E staining, $\times 400$.

한 조직적 손상이 관찰되었다. 한편, ethanol과 DSF을 동시에 처리한 마우스의 간 조직에서는 이러한 간 조직의 손상이 심하게 나타나지 않았다(Fig. 3D). 그리고 ethanol을 3주간 처리 후 DSF을 처리한 집단에서는 조직학적으로 분석한 결과 약한 간손상이 나타났으며 일부에서는 간문맥 주위의 림프구의 침투, 간조직 괴사, 약한 정도의 복합적 염증 발생 등의 조직적 손상이 관찰되기도 하였으나 심한 섬유화나 간경화는 관찰되지 않았다(Fig. 3E).

고 찰

인체에 있어서 알코올의 장기간의 섭취는 간 조직의 병리학적 변화를 초래하게 된다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 알코올 중독성 섭취는 간세포 손상이 원인이 된다. 에탄올은 염증, 괴사, 섬유화, 지방질 및 콜라겐의 침적, 간 비대, 그리고 간경화에 의하여 간세포 조직의 형태적 변화를 초래한다.^{19,20)} DSF는 이화작용에 의한 알코올 대사를 저해하는 약물 중 하나이다. DSF는 알코올과 acetaldehyde의 산화작용을 감소시키고, 알코올과 알데하이드(aldehyde) 분해효소의 대사를 저해하는 기능이 있다.¹⁵⁾

본 연구에서 ALT와 AST의 생화학적 수치가 에탄올만을 처리한 집단의 마우스가 유의한 증가를 보여주었고, DSF 처리 군이 정상집단(control group)보다 높은 경향을 보여주었다. 그러나 에탄올과 DSF를 동시에 처리한 집단에서는 에탄올만을 처리한 집단보다 ALT와 AST의 값이 유의하게 낮았다. LDH 효소의 수준은 DSF 처리 집단에서 유의하게 높았다. 알코올 중독의 원인으로 작용하고 있는 지방산의 대사변화와 지방간의 유도는 아직까지 완전하게 메커니즘이 밝혀지지 않았다. 혈중 triglyceride (TG), CHOL, 그리고 low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)의 증가는 비 알코올성 지방간 환자에서 알코올성 지방간 환자 보다 일반적으로 많이 나타난다.²¹⁾ 본 연구에서는 혈중 콜레스테롤의 함량이 정상집단(control group)에 비하여 ethanol을 처리한 집단과 DSF를 처리한 집단간에 유의한 차이가 존재하였으며, 특히 DSF 집단에서 가장 높았다.

이러한 결과로 볼 때, 에탄올의 지속적 섭취는 간 기능의 이상을 초래할 수 있음을 확인할 수 있었으며, DSF는 에탄올에 의해 간 독성이 유도되는 것이 저해되고 간 기능의 회복에 효과적일 수 있음을 확인할 수 있었으나, DSF가 간의 cholesterol치를 유의하게 높이고 있는 결과로부터 DSF에 의한 간 조직의 보호 효과가 ethanol에 의해서 유도되는 간 독성에 대한 부수적인 효과에 따른 자가

면역 기능 개선에 관한 효과일 수도 있을 것으로 추정되며 사이토카인이나 효소의 활성화에 대한 심도 있는 연구 성과가 기대된다.

결 론

본 연구는 마우스의 알코올성 간질환에 대하여 disulfiram (DSF)의 효과를 알아보기 위하여 수행하였다. C57BL/6 마우스를 5개의 집단으로 나누었다. Control (normal)군, 에탄올 처리 모델군, DSF 처리군, 에탄올과 DSF 처리군, 그리고 에탄올 3주 처리 후 DSF 처리 군으로 나누었다. 마우스의 체중과 간의 무게가 증가됨을 확인할 수 있었는데, 실험시작 후 1주일 후에는 에탄올 처리군에서 체중의 감소가 있었으나, 2주 후에는 모든 집단에서 유사하였다. 3주 후에는 에탄올과 DSF를 동시에 처리한 군에서 유의하게 증가됨을 보여주었으나, DSF 처리군과 정상군(control group)에서는 유사한 체중을 보였다. 마우스의 간 중량은 에탄올 처리 군에서 다른 집단에 비하여 유의하게 무거웠다. 혈중 ALT, AST, 그리고 CHOL 농도는 에탄올 처리 군에서 유의하게 증가되었으며, CHOL과 LDH 농도는 DSF 처리 군에서 유의하게 증가되었다. H&E 염색법을 이용하여 간 조직의 염증반응을 분석한 결과, 에탄올 처리 군에서는 간문맥 주위의 림프구의 침투, 간 조직 괴사, 심한 수준의 복합적 염증 등 간 조직 손상이 나타나 악화되고 있음을 확인할 수 있었다. 에탄올과 DSF를 동시에 처리한 마우스에서는 간문맥 주위의 림프구의 침투, 간 조직 괴사, 약한 수준의 간 조직의 손상을 보였으며, 에탄올을 3주간 처리 후 DSF를 처리한 집단에서는 에탄올 처리 군에서 보여지는 간 조직 손상이 경감되었으나, 에탄올과 DSF를 동시에 투여한 군에서 보다는 약간 더한 수준의 간 조직 손상이 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때, DSF는 에탄올에 의해 간 독성의 유도될 때 간 조직의 치료 효과를 얻을 수 있을 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- 1) Saravanan N, Rajasankar S, Nalini N. Antioxidant effect of 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid on ethanol-induced hepatotoxicity in rats. *J Pharm Pharmacol* 59, 445-453, 2004.
- 2) Kim YH, Shin MJ. Effect of high taurocholate load on activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes. *Exp Mol Med* 34, 123-130, 2006.
- 3) Choi JS, Yoon TJ, Kang KR, Lee KH, Kim WH, Sun YH, Song J, Jung MH. Glycoprotein isolated from *Acnthopanax*

- senticosus* protects against hepatotoxicity induced by acute and chronic alcohol treatment. *Biol Pharm Bull* 29, 306-314, 2006
- 4) Gemma S, Vichi S, Testai S. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanita* 42, 8-16, 2006
 - 5) Freeman TL, Tuma DL, Thiele GM, Klassen LW, Worrall S, Niemela O, Parkkila S, Emery PW, Preedy VR. Recent advances in alcohol-induced adduct formation. *Alcohol Clin Exp Res* 29, 1310-1316, 2005.
 - 6) Lumeng L, Crabb DW. Alcoholic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 16, 208-218, 2000.
 - 7) Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad Med J* 76, 280-286, 2007
 - 8) Koh HJ, Lee SM, Son BG, Lee SH, Ryoo ZY, Chang KT, Park JW, Park DC, Song BJ, Veech RL, Song H, Huh TL. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem* 279, 39968-39974, 2004.
 - 9) Niemela O, Parkkila S, Bradford B, Iimuro Y, Pasanen M, Thurman RG. Effect of Kupffer cell inactivation on ethanol-induced protein adducts in the liver. *Free Radic Biol Med* 33, 350-355, 2002.
 - 10) Bujanda L, Garcia-Barcia M, Gutierrez-de Juan V, Bidaurrezaga J, de Luco MF, Gutierrez-Stampa M, Larzabal M, Hijona E, Saraqueta C, Echeque-Elizondo M, Arenas JJ. Effect of resveratrol on alcohol-induced mortality and liver lesions in mice. *BMC Gastroenterol* 14, 6-35, 2006
 - 11) Balasubramaniyan V, Nalini N. Effect of hyperleptinaemia on chronic ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 20, 129-136, 2006.
 - 12) Siegmund SV, Brenner DV. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis* 23, 64-74, 2005.
 - 13) Mirsal H, Yalug I, Tan D, Stern TA, Kalyoncu A, Pektas O, Erdogan G, Beyazyurek M. Delirium-associated DSF and ethanol interactions. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 7, 235-237, 2005.
 - 14) De Sousa A, De Sousa A. An open randomized study comparing disulfiram and acamprosate in the treatment of alcohol dependence. *Alcohol Alcohol* 40, 545-548, 2005.
 - 15) Wilson CW. The pharmacological actions of alcohol in relation to nutrition. *Proc Nutr Soc* 31, 91-98, 1972.
 - 16) Kido R, Sato I, Tsuda S. Detection of in vivo DNA damage induced by ethanol in multiple organs of pregnant mice using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *J Vet Med Sci* 68, 41-47, 2006.
 - 17) Bourdelat-Park BN, Anderson GM, Donaldson ZR, Weiss JM, Bonsall RW, Emery MS, Liles LC, Weinschenker D. Effects of dopamine β -hydroxylase genotype and DSF inhibition on catecholamine homeostasis in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 183, 72-80, 2005.
 - 18) Slukvin II, Boor PJ, Jerrells TR. Initiation of alcoholic fatty liver and hepatic inflammation with a specific recall immune response in alcohol-consuming C57Bl/6 mice. *Clin Exp Immunol* 125, 123-133, 2001.
 - 19) Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res Health* 24, 93-104, 2000.
 - 20) Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa S. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 80, 1033-1039, 2007.
 - 21) Chen QK, Chen HY, Huang KH, Zhong YQ, Han JA, Zhu ZH, Zhou XD. Clinical features and risk factors of patients with fatty liver in Guangzhou area. *World J Gastroenterol* 10, 899-902, 2004.