

# 五苓散이 Galactosamine 誘導 肝毒性 흰쥐의 Antioxidant Enzyme 活性과 Lipid peroxidation에 미치는 影響

東國大學校 韓醫科大學 肝系內科學教室

李俊熹·姜允皓

## I. 緒論

五苓散은 張<sup>20)</sup>의 傷寒論에 記錄된 이래 대표적인 利水滲濕劑로서 化氣利水<sup>1,17)</sup>의 효능으로 胃腸炎, 嘔吐, 浮腫, 陰囊水腫, 黃疸, 肝硬變의 腹水, 腎炎, 尿毒症, 頭痛, 眩暈 및 假性近視<sup>8,16,17,21,24,26)</sup> 등 임상에 광범위하게 활용되고 있다.

인체의 水液代謝는 주로 腎의 作用이고, “氣可以化水”라 하여 氣機作用이 중요시 되었다.<sup>3,5)</sup> 輸布, 排泄機能은 氣機의 升降出入에 의해서 肺, 脾, 腎, 三焦, 膀胱 등의 협력에 의해 氣化作用으로 이루어지고, 氣화에 있어서 肝은 氣운동의 疏通과 暢達에 관여(肝主疏泄)하므로서 수분대사에 영향을 미치고 이는 利水作用에 대하여 일정한 작용을 한다.<sup>3,13)</sup> 하여 肝의 運用을 나타내고 있다.

肝은 약물과 다른 외부의 물질을 대사하는 주된 장기이며 약물 자체뿐만 아니라 그 대사물들에도 노출되는 취약성을 가지고 있고, 腎臟은 순환중인 약물에 많이 노출되는 혈류역학적인 면과, 세뇨관에서의 수분 재흡수로 독성 물질이 농축이 되며, 신세뇨관은 능동 수송과 대사기능으로 에너지 소모가 많으나 세뇨관의 경우 혈류가 원활히 공급되지 못해 만성적인 저산소상태에 있어<sup>5,15)</sup> 肝, 腎 장기의 손상되는 경우가 많으므로 약물중독의 치료는 콩팥 기능, 산염기 평형, 전해질 평형 등을 유지하는 것이 중요하다.<sup>6,10)</sup> 간효소의 도입은 불활성화

가 그 산소활성으로 유발되는 지속성인 약물에 의한 중독에는 유망할 것<sup>2,7)</sup>이라 한다.

活性酸素類들은 세포막의 과산화반응을 유도하여 조직손상과 기관의 퇴행성변화를 가속화하고 암을 포함한 각종 난치질환의 병인, 약물을 포함한 여러 화합물에 의한 독성 및 노화에 이르기 까지 그 유발인자로서 깊은 연관이 있으며<sup>28,30,36)</sup> 세포는 이와 같은 활성산소 화합물을 파괴하기 위하여 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione(GSH)-peroxidase 등을 포함한 방어 메카니즘을 갖고 活性酸素類를 분해하여 생물체를 보호하고 있다.<sup>9)</sup>

오령산에 대한 실험보고로서 李<sup>14)</sup>는 利尿효과와 尿의 滲透質 濃度の 증가를, 金<sup>11)</sup>은 尿量, 尿中 滲透質 濃度の 증가 및, renin活性度の 증가와 ANP농도의 감소를, 서<sup>12)</sup>등은 혈장 aldosteroned의 변화를 보고하였고, 이<sup>17)</sup>는 利尿作用, 수분·전해질 대사, 抗潰瘍작용 및 기타 에탄올 투여로 야기된 肝臟 중의 triacylglycerol의 증가와 간지질의 진행을 억제하는 작용이 있음을, 신<sup>13)</sup>등은 四鹽化炭素의 투여로 손상된 肝의 SOD활성증가와 LPO함량의 유의한 감소를 보고하여 五苓散이 肝독성에 대하여 일정한 해독작용이 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 이러한 연구결과를 토대로 肝毒性에 대한 五苓散의 해독효능을 검토하고자 과산화지질(Lipid peroxide:LPO)과 活性酸素 分解系 酵素 活性 變化 및 組織學的 變化

를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗재료

#### (1) 약재 및 시약

본 실험에 사용한 五苓散의 處方 구성과 1첩의 분량은 다음과 같다.

澤 瀉 ( <i>Alismatis Rhizoma</i> )	10g
赤茯苓 ( <i>Hoelen</i> )	6g
白 朮 ( <i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i> )	6g
猪 苓 ( <i>Polyporus</i> )	6g
肉 桂 ( <i>Ciniamomi Cortex</i> )	2g
합 계	30g

본 실험에 사용한 시약은 Bovine serum albumin, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid); (DTNB), ethylenediamine tetraacetic acid; (EDTA), galctosamine, hematoxylin, sodium dodecyl sulfate(SDS), thiobarbituric acid (TBA), sulfosalicylic acid, potassium phosphate, Tris 등은 모두 Sigma사 제품을 사용하였고 Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 Merck사 제품을 Folin Phenol reagent, ethanol, pyridine, n-butanol은 일제 특급품으로 사용하였고 이외에 실험에 사용한 모든 시약은 시중의 일급품이상의 제품을 사용하였다.

#### (2) 실험동물

체중 200g內외의 Sprague-Dawley系 암컷 흰쥐를 固形飼料와 물을 충분히 공급하면서 10일이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 實驗방법

#### (1) 검액의 제조

五苓散을 4첩 분량인 120g을 round flask에 증류수 1000ml와 함께 넣은 뒤 heating mantle에서 냉각기를 부착하고 2시간 동안 가열 추출한 다음, 여과한 餘液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 100ml가 되게 하였다.

濃縮液 100ml에 ethanol을 가하여 ethanol농도 75%용액으로 만들어 여과한 여액을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 100ml가 되게 하였다.

다시 농축액 100ml에 ethanol을 가하여 ethanol농도 85%용액으로 만들어 여과한 餘液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 100ml가 되게 하였다.

다시 농축액 100ml에 ethanol을 가하여 ethanol농도 95%용액으로 만들어 여과한 餘液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 100ml가 되게 하였다. 다시 농축액 100ml에 증류수 100ml를 가하여 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 100ml가 되게 한 다음 syringe filter(0.2 $\mu$ m)로 여과한 후 檢液으로 사용하였다.

#### (2) 실험동물의 처치

흰쥐 6마리씩을 1군으로하여 정상군과 대조군 및 실험군으로 나누었으며, 실험군을 다시 실험군 1, 실험군 2로 나누었다.

대조군은 실험 8일과 9일째에 galactosamine을 400mg/kg/day씩 복강주사 하였다.

실험군은 五苓散 검액을 실험군 1에서는 0.5 ml/200g/day씩 7일동안 복강주사 하였고, 실험군 2에서는 0.5ml/200g/day씩 7일동안 복강주사한 후 모두 8일과 9일째에 galactosamine을 400mg/kg/day씩 복강주사하였다.

각 군은 모두 9일째에 ether로 마취시킨후 복부 정중선을 따라 개복한 후 0.9% 생리식염수로 관류시켜 조직에서 혈액을 모두 제거한 후 肝臟을 적출하여 남아있는 생리식염수를 모두 제거한 후 -70℃에서 동결보존하면서 사

용하였다.

효소활성도 측정을 위해 간조직 일정량에 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 4배 용량(V/W)으로 가한 다음 homogenizer (Janke & Kunkel사의 Ultra-Turrax 25)로 2분간 균질화하였고 이를 600×g에서 원심분리하여 상층액을 취한후 다시 100,000×g에서 1시간동안 원심분리하여 상층액인 시토플 분획을 효소원으로 사용하였다.

위의 모든 과정은 4°C이하에서 수행하였다.

### (3) 조직중 Lipid peroxide(LPO) 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법<sup>30)</sup>에 준해 간조직의 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다.

과산화지질의 함량은 조직 1g당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

### (4) 조직중 Superoxide dismutase(SOD)

#### 활성 측정

SOD활성 측정은 Martin 등의 방법<sup>28)</sup>에 준해 실시하였다. 효소 활성도 측정은 0.1mM EDTA가 함유된 50mM 인산염 완충액(pH 7.5) 일정량에, 효소원으로 분리된 시토플 분획에 0.4배량의 에탄올-클로로포름 혼합액(5:3)을 가하여 5분간 vortex로 혼합한 후 10,000×g에서 20분간 원심분리한 상층액을 용량을 달리 하여 넣고 상온에서 5분간 incubation한 후 5mM hematoxylin용액을 첨가하여 파장 560nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소활성단위(Unit)는 hematoxylin이 자동산화하는 흡광도치의 50%를 억제하는 효소의 양을 1Unit로 하였다.

### (5) 조직중 catalase 활성 측정

Catalase의 활성도는 Aebi의 방법에 따라 다음과 측정하였다. 50mM 인산염 완충액(pH 7.0) 2.0ml에 효소원 일정량, 기질로서 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액 1ml을 가하여 파장 240nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정했다. 대조실험으로는 기질인 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 대신에 50mM 인산염 완충액(pH 7.0) 1ml을 가해 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정했다. 효소의 활성도는 1분 동안에 1μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시키는 효소의 양을 1Unit로 하였다.

### (6) 조직중 Glutathione(GSH) 함량 측정

간조직내 GSH 함량측정은 Ellman 등의 방법에 따라 측정하였다. 10% 간조직 균질액 일정량에 0.5ml의 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 3000rpm에서 10분동안 원심분리한 후 상층액 0.3ml씩을 취하여 2.7ml의 1mM DTNB용액과 혼합한 후 실온에서 10분간 방치한 후 흡광도 412nm에서 측정하였다.

### (7) 간조직 표본의 제작

실험동물을 ether로 마취시켜 간을 적출하였다. 적출된 간조직은 10% 중성포르말린 용액에 실온에서 24시간 동안 고정하여 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 다음 5μm두께로 연속절편을 만들었다.

연속절편은 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### (8) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry<sup>27)</sup>의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준단백으로하여 측정하였다.

### (9) 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차로 표현하고, 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 P<0.05 수준에서 상호 비교하였다.

### III. 實驗成績

#### 1. 組織中 LPO 含量測定

조직중 LPO 함량의 변화는 정상군에 있어서  $11.83 \pm 2.68$  nmoles/g of tissue이었다.

대조군은  $21.92 \pm 3.59$  nmoles/g of tissue로 정상군에 비하여 유의성있게 증가하였다.

실험군 1에서는  $13.69 \pm 1.4$  nmoles/g of tissue로 정상군에 비하여 유의한 차이는 보이지 않았다.

실험군 2에서는  $13.20 \pm 1.34$  nmoles/g of tissue로 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다.

Table I. Effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the LPO content in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Group	Content (MDA nmoles/g of tissue)
Normal	$11.83 \pm 2.68$
Control	$21.92 \pm 3.59$ #
Test 1	$13.69 \pm 1.40$
Test 2	$13.20 \pm 1.34$ *

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml /200g/day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

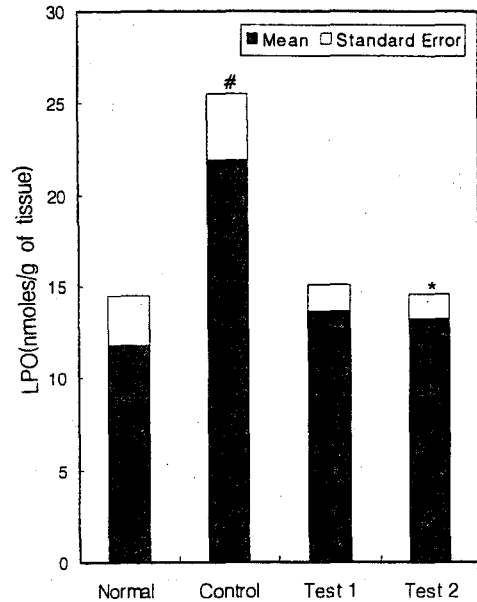


Figure 1. Comparison of the effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the LPO content in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml /200g/day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

## 2. 組織中 SOD 活性測定

조직중 SOD 활성의 변화는 정상군에 있어서  $3.20 \pm 0.80$  unit/mg of protein이었다.

대조군은  $1.14 \pm 0.46$  unit/mg of protein으로 정상군에 비하여 유의성있게 감소하였다.

실험군 1에서는  $4.63 \pm 1.80$  unit/mg of protein으로 정상군에 비하여 유의한 차이는 보이지 않았다.

실험군 2에서는  $1.79 \pm 0.35$  unit/mg of protein으로 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다.

Table II. Effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the SOD activity in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Group	Activity (unit/mg of protein)
Normal	$3.20 \pm 0.80$
Control	$1.14 \pm 0.46$ #
Test 1	$4.63 \pm 1.80$
Test 2	$1.79 \pm 0.35$ *

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml /200g/day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

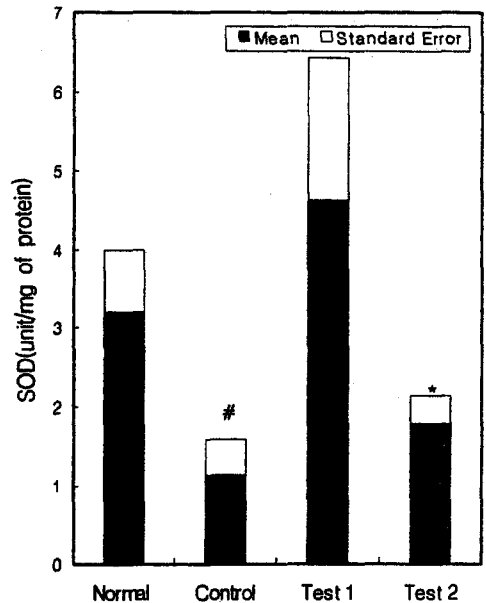


Figure 2. Comparison of the effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the SOD activity in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml/200g /day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

### 3. 組織中 Catalase 活性測定

조직중 Catalase 활성의 변화는 정상군에 있어서  $23.85 \pm 1.50$  unit/mg of protein이었다.

대조군은  $15.49 \pm 1.67$  unit/mg of protein으로 정상군에 비하여 유의성있게 감소하였다.

실험군 1에서는  $26.13 \pm 1.75$  unit/mg of protein으로 정상군에 비하여 유의한 차이는 보이지 않았다.

실험군 2에서는  $20.01 \pm 1.32$  unit/mg of protein으로 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다.

Table III. Effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the catalase activity in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Group	Activity (unit/mg of protein)
Normal	$23.85 \pm 1.50$
Control	$15.49 \pm 1.67$ #
Test 1	$26.13 \pm 1.75$
Test 2	$20.01 \pm 1.32$ *

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml/200g /day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

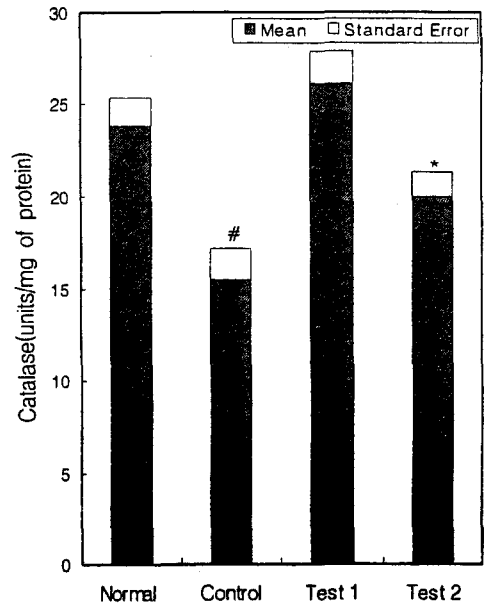


Figure 3. Comparison of the effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the catalase activity in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml /200g/day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

#### 4. 組織中 GSH 含量測定

조직중 GSH 함량의 변화는 정상군에 있어서  $2.77 \pm 0.29 \mu\text{ moles/g}$  of tissue이었다.

대조군은  $2.11 \pm 0.49 \mu\text{ moles/g}$  of tissue로 정상군에 비하여 유의성있게 감소하였다.

실험군 1에서는  $2.63 \pm 0.25 \mu\text{ moles/g}$  of tissue로 정상군에 비하여 유의한 차이는 보이지 않았다.

실험군 2에서는  $3.10 \pm 0.44 \mu\text{ moles/g}$  of tissue로 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다.

Table IV. Effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the GSH content in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Group	Content ( $\mu\text{ moles/g}$ of tissue)
Normal	$2.77 \pm 0.29$
Control	$2.11 \pm 0.49$ #
Test 1	$2.63 \pm 0.25$
Test 2	$3.10 \pm 0.44$ *

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml /200g/day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

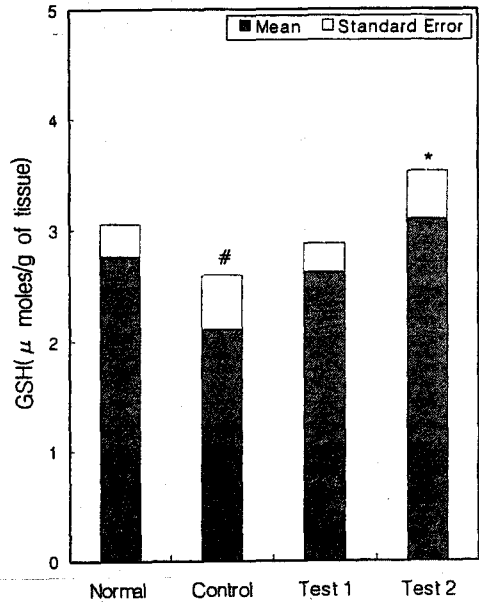


Figure 4. Comparison of the effect of pretreatment of *ORyungSan* extract on the GSH content in the liver of rat with treatment of galactosamine.

Values are mean  $\pm$  standard error(n=6)

Normal : Non-treated group

Control : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day

Test 1 : Injection of *ORyungSan* extract 0.5 ml/200g/day for 7days

Test 2 : Injection of galactosamine 400mg/kg /day at 7 and 8day after injected with *ORyungSan* extract 0.5ml /200g/day for 7days

# : Stastical significance as compared with normal group.

\* : Stastical significance as compared with control group.

## 5. 肝組織 所見

정상군과 비교했을 때 실험군 1은 별 다른 차이가 나타나지 않았으나(Fig. 6), 대조군은 Galactosamine 주사 후 간세포의 손상으로 간 표면에 공간을 외부에서 관찰 할 수 있었다. 그리고 대조군에서는 림프구가 집중된 염증현상과 간세포판의 소실이 중심정맥 주변부에서 나타났으며(Fig. 7), 간세포에서는 많은 액포화(vacuolate)를 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 대조군에 비해 실험군 2는 염증현상과 간세포판의 손상은 일부 중심정맥 주변부에서 소수가 나타났으며(Fig. 9) 간세포의 액포화도 줄어든 것으로 관찰되었다(Fig. 10).

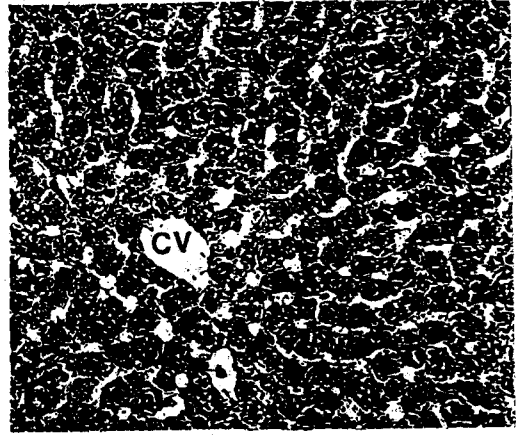


Fig. 6. The liver in rat with treatment of *ORyungSan*. The structure of liver same as normal liver. H & E.  $\times 200$ .

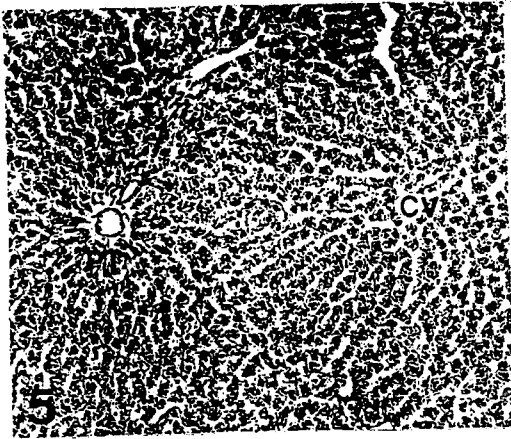


Fig. 5. The normal structure of liver in Rat. CV, Central vein : PT, Portal triad. H & E.  $\times 100$ .

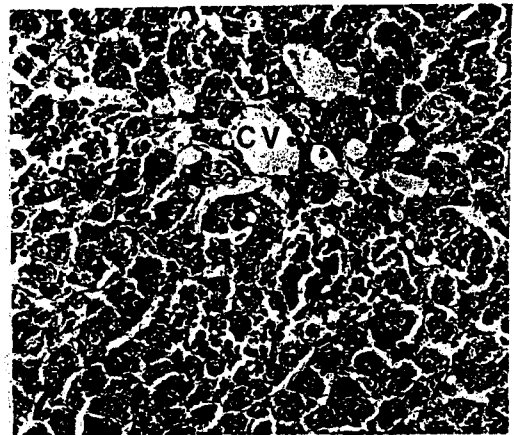


Fig. 7. The liver in rat intraperitoneally injected with galactosamine. The inflammation(arrow) aggregated lymphocytes were appeared in the area of central vein and the hepatic plate destructed. H & E.  $\times 200$ .



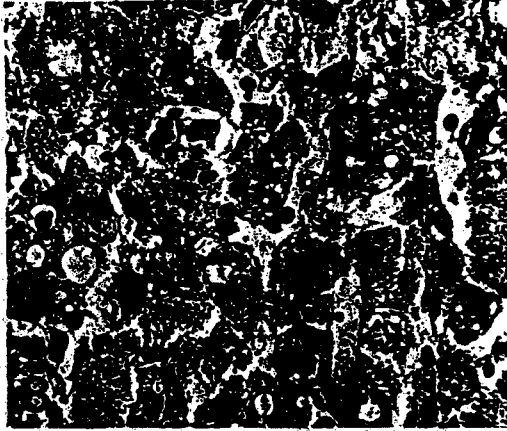


Fig. 8. The hepatocyte in rat intraperitoneally injected with galactosamine. The vacuolation(arrow) and destructed hepatocytes were appeared. H & E.  $\times 400$ .

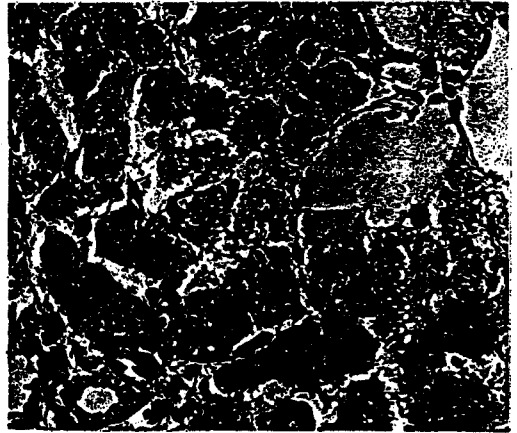


Fig. 10. The hepatocyte after galactosamin injection with daily treatment of *ORyungSan*. The vacuolation (arrow) were reduced than control group and destructed hepatocytes were repaired. H & E.  $\times 400$ .



Fig. 9. The liver after galactosamine injection with daily treatment of *ORyungSan*. The inflammation were disappeared in the area of central vein and the hepatic plates were repaired. H & E.  $\times 200$ .

## IV. 考 察

五苓散은 傷寒論에 처음으로 記載되어 水氣不化 氣化不行하여 水濕內停의 病變에 運用하였고, 王<sup>18)</sup>은 五苓散의 藥效를 “오로지 熱을 蕩滌하고 燥를 滋潤하며 火를 引導하고 津液을 生하여 腫에 나타나므로 痞를 消하는 데에도 良方이다” 라고 하였다.

五苓散의 應用을 보면 通陽化氣하고 健脾利水の 效能으로 胃腸炎, 嘔吐, 浮腫, 陰囊水腫, 黃疸, 肝硬便의 腹水, 腎炎, 尿毒症, 頭痛, 眩暈 그리고 심지어 皮膚科에서 帶狀疱疹과 瘙癢證과 假性近視,<sup>8,16,17,21,24,26)</sup> 등 臨床應用범위가 광범위하게 적용되고 있다. 한편 실험 보고로는 李<sup>14)</sup>는 利尿효과와 尿의 滲透質 濃度の 증가를, 金<sup>11)</sup>은 尿量, 尿中 滲透質 濃度の 증가 및, renin活性的의 증가와 ANP농도의 감소를, 서<sup>12)</sup> 등은 血漿 aldosteroned의 변화를, 이<sup>17)</sup>는 利尿作用, 水分· 전해질 대사, 抗潰瘍작용 및 기타 에탄올 투여로 야기된 肝臟 中の triacylglycerol의 증가와 肝脂質의 進行을 억제하는 작용이 있음을, 신<sup>13)</sup> 등은 四鹽化炭素의 투여로 손상된 肝의 SOD활성증가와 LPO함량의 유의한 감소를 보고하였다.

이상의 연구 결과를 볼 때 五苓散은 利尿作用과 水分, 電解質의 調整機能 및 過산화지질 반응에 영향을 미쳐 毒物質의 解毒에 상당한 效能이 있을 것으로 思料되어 Galactosamine 유도 간독성 흰쥐의 항산화 효소의 변화를 관찰하였다. Galactosamine은 serum transaminases(GOT and GPT)를 심하게 상승시켜 간손상을 야기시킨다 하였고<sup>29)</sup> 간세포의 괴사와 감염을 일으킨다<sup>31)</sup> 하였다. 또한 糖代謝에서 조직의 糖消費에 변화를 일으켜 저혈당을 유발한다<sup>38)</sup> 하였고, 간세포의 糖蛋白質代謝에 있어 다양한 효소활동을 변화하여 간독성을 유발<sup>27)</sup> 하는 것으로 알려져 있다.

細胞膜은 水分과 電解質의 均衡을 維持하여 細胞의 부피 및 삼투압을 일정하게 조절하고

세포 외부에서 오는 여러 가지 정보를 전달해주는 창구 역할을 하며 細胞膜에서 일어나는 受動的 또는 能動的인 물질 이동을 통해 세포에 필요한 營養分을 공급받고 老廢物을 제거한다. 다양한 역할을 수행하고 있는 細胞膜에 손상이 일어나면 細胞에 치명적인 손상을 유발할 것임에 틀림없다. 그 중 free radical에 의한 細胞損傷의 기전이 일반적인 細胞損傷 과정의 최종 공통 경로로 여겨지고 있다. Free radical은 어떤 물질이나 원자로도 구성될 수 있으나 생물학적으로 중요한 것은 산소 또는 탄소 중심의 유리기이다.<sup>4)</sup>

活性 酸素類들은 體內에서 分解系를 통해 毒性이 輕減하거나 無毒化되어 지기도 하지만, 細胞膜의 다가불포화 지방산을 공격하여 過酸化脂質을 형성하며 이들은 다시 인접부위의 다가불포화 지방산의 過산화반응을 유도하여 또 다른 過酸化脂質을 생성하는 自家觸媒連鎖反應을 시작하여 불포화 지방산의 상실을 초래하고 또 광범위한 막손상을 초래하여 조직의 손상과 기관의 퇴행성 변화를 가속화하는 것으로 알려져 있다.<sup>4,28,30)</sup>

이처럼 生物體에 치명적인 손상을 일으키는 活性酸素를 제거시켜 주는 抗酸化劑로서 작용을 하는 酵素에는, 過酸化물을 過酸化水素로 전환시키는 superoxide dismutase(SOD)와 peroxisome내에 존재하며 過산화수소를 산소와 물로 분해하는 catalase, 그리고 glutathione의 -SH기로 부터 수소를 유리하여 수산화나 過산화수소에 수소를 주도록 촉매하는 glutathione(GSH)-peroxidase가 있다.<sup>4,9)</sup>

五苓散 檢液을 실험동물에 일주일간 전 처치한 후 galactosamine을 투여하였을 때 肝組織中の LPO 含量은 대조군에서는 정상군에 비하여 약 45%의 증가를 나타내던 것이 정상수준에 가깝게 현저히 감소되어짐을 관찰할 수 있었다. 四鹽化炭素를 이용한 肝損傷 실험을 한 신<sup>13)</sup>의 보고에 의하면 五苓散은 첨가 농도에 의존적으로 LPO의 생성을 억제시킴과 동시에 五苓散 전 처치에 의한 실험군에서

LPO가 감소되어짐을 보고하였다. 따라서 五苓散이 LPO의 생성을 억제시키는 것으로 보아 活性酸素의 작용을 억제시키는데 직접적인 영향이 있을 것으로 思料된다.

SOD 活性 變化를 관찰하였을 때 galactosamine 투여에 의해서 현저히 억제되던 것이 五苓散 전 처치에 의해서 유의성있는 증가를 보였다. 단지 五苓散만의 투여에 의해서는 정상군보다 훨씬 높은 활성을 보였으나 통계적 유의성은 인정되지 아니하였다.

Catalase 활성 변화를 관찰하였을 때 galactosamine 투여에 의해서 현저히 억제되던 것이 五苓散 전 처치에 의해서 약 25% 활성 증가를 보였으며 단지 五苓散만의 투여에 의해서는 정상군보다 훨씬 높은 활성을 보였으나 통계적 유의성은 인정되지 아니하였다.

GSH 함량을 관찰하였을 때 galactosamine 투여에 의해서 유의성있는 감소를 보이던 것이 五苓散 전 처치에 의해서 약 33% 함량 증가를 보였다.

이상의 결과는 Seckin S 등<sup>37)</sup>이 galactosamine 유도 간독성에 있어서의 LPO, GSH 의 변화와 부합되고 있다.

肝 組織學的 所見을 보면 galactosamine 투여에 의해서 간세포판의 소실과 염증현상이 나타났으며 많은 핵포화를 보였다. 이는 Isogai<sup>29)</sup>와 Liehr<sup>31)</sup>의 보고와 일치하고 있고, 五苓散 전 처치한 실험군에서는 이들 현상이 줄어든 것으로 관찰되었다.

본 實驗에서 五苓散이 過酸化脂質의 생성 억제와 더불어, 活性酸素를 제거시켜 주는 抗酸化 酵素들의 활성 증가를 보였으며 組織學的 소견에서도 염증현상 및 핵포화 현상도 줄어들었다. 이러한 효과는 五苓散이 활성산소의 작용을 억제하여 직접적이든 간접적이든 세포막을 보호할 것으로 보여지고, 수분· 전해질대사에 영향을 미쳐 細胞內로 나트륨과 물의 유입 및 포타슘 유출로 말미암아 세포종창을 일으키는 것을 방지할 것으로 여겨진다.

이러한 결과로 미루어 肝毒性 및 肝病變시

에 五苓散의 臨床應用은 肝機能 회복 및 치료 효능이 인정될 것으로 思料된다.

## V. 結 論

五苓散이 肝中毒에 대한 개선효능을 알아보기 위해 Galactosamine으로 간독성을 유발하여 肝臟중 LPO의 함량, catalase, SOD, GSH 활성 및 조직적 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPO의 함량은 五苓散을 전 처치한 실험군이 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다.
2. SOD의 함량은 五苓散을 전 처치한 실험군에서는 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보였다.
3. Catalase의 활성은 五苓散을 전 처치한 실험군에서는 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보였다.
4. GSH의 활성은 五苓散을 전 처치한 실험군에서는 대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보였다.
5. 肝組織 所見에서는 대조군에서는 염증현상, 간세포판의 소실 및 핵포화가 관찰되었고, 五苓散을 전 처치한 실험군에서는 염증현상 및 간세포판의 손상은 중심정맥 주변부에서 소수가 나타났고 간 세포의 핵포화도 줄어든 것으로 관찰 되었다.

이상의 실험 결과로부터 五苓散은 Galactosamine에 의한 간독성의 예방과 회복에 대하여 효소 활성을 통한 간조직 복원을 향상시키는데 일정한 효과를 보였음을 확인할 수 있었다.

## 參考文獻

1. 康舜洙 외: 方劑學, 서울, 癸丑文化社, pp.166-167, 1984.
2. 金秉雲 외 : 肝系內科學, 서울, 東洋醫學研究院, pp.24-26, 195-197, 565-579, 1989.
3. 金完熙·崔達永 共編 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp.141-143, 398-399, 1985.
4. 대한병리학회: 병리학[ I ] 제2판, pp.31-45, 1995.
5. 杜鎬京: 東醫腎系內科學, 서울, 東洋醫學研究院, pp.11-27, 96-99, 1989.
6. 서울대학교의과대학약리학교실: 약리학, 서울, 고려의학, pp.37-44, 400-422, 1994.
7. 李文鎬 외 : 內科學, 서울, 학림사, pp.2364-2370, 1986.
8. 李常仁 監修 : 天真處方解說, 서울, 成輔社, pp.192-193, 1987.
9. 채범석 역 : Lehninger 생화학 제2판, 서울, 서울의국서적, pp.36-37, 121-123, 365-369, 528-529, 756-759, 1995.
10. 홍사석·이우주 : 약리학 강의, 서울, 의학문화사, pp.66-68, 1993.
11. 金京娥 : 五苓散煎湯液의 胃內 直接投與가 白鼠의 腎臟機能과 血漿 Renin活性度 및 Atrial Natriuretic Peptide 濃도에 미치는 影響, 圓光大學校 碩士學位論文, 1994
12. 서재영 외 : 五苓散去豬苓 煎湯液이 백서의 혈장 Renin 활성도, 혈장 Aldosterone 및 Atrial Natriuretic Peptide 농도에 미치는 영향, 東醫 生理學會誌, 11(1),165-170, 1996.
13. 신흥목 외 : 五苓散의 전 처치가 CCl<sub>4</sub> 投與로 인한 흰쥐 간의 SOD 活性 및 過酸化脂質 含量에 미치는 影響, 東醫生理學會誌, 11(1),171-180, 1996.
14. 李尙仁 : 五苓散 및 加味五苓散이 家兔利尿 作用에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 4,13-25, 1981.
15. 張仁鎭 : 간장과 신장에 대한 약물의 부작용, 대한의학협회지, 37(10), 1186-1196, 1994.
16. 高山宏世 : 中醫方劑病證圖解, 山西科學技術出版社, pp.234-235, 1991.
17. 李向中 : 中醫方劑的藥理及臨床應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.50-57, 1992.
18. 王 昂 : 國譯醫方集解(蔡仁植, 孟華燮 共譯), 서울, 大成文化社, pp.369-373, 1984.
19. 張啓基 외 : 傷寒論手冊, 重慶, 科學技術文獻出版社重慶分社, p.206, 1984.
20. 張仲景 : 仲景全書, 서울, 大成文化社, 1989.
21. 陳無擇 : 三因方, 서울, 翰成社, pp.185-186, 1977.
22. 白成振 : 五苓散臨床應用舉隅, 吉林中醫藥, 6, 27, 1992.
23. 常 林 : 五苓散在耳鼻喉科中應用舉隅, 河南中醫 3,12-13, 1990.
24. 涂建中 : 五苓散研究三十年回顧, 云南中醫雜誌, 9(5), 43-46, 1988.
25. 鮑朝輝 : 四君子湯對內毒素激活白細胞誘發肝勻漿脂質過酸化物的影響, 北京中醫藥大學學報, 17(2),61-63, 1994.
26. 矢數道明 : 韓方治療百話 第3輯, 서울, 東南出版社, pp.247-259, 1984.
27. Dwivedi Y., Rastogi R., Garg NK., Dhawan BN. : Perfusion with picroliv reverses biochemical changes induced in livers of rats toxicated with galactosamine or thioacetamide, Planta Medica, 59(5),418-420, 1993.
28. Freemann, B.A. and Crapo, J.D. : Biology of disease: Free radicals and tissue injury, Lab. Invest, 47,412-426, 1982.
29. Isogai M., Oishi K., Yamaguchi M. : Serum release of hepatic calcium-binding protein by liver injury with galactosamine administration in rats, Molecular & Cellular Biochemistry,

- 136(1),85-90, 1994.
30. Larry, W. O. and Terry, B. O. : Free radicals, aging and degenerative disease. Alan R.Liss Inc. pp.325-371, 1986.
31. Liehr H., Grun M., Seelig H P., Seelig R., Reutter W., Heine W D. : On the pathogenesis of galactosamine hepatitis. Indications of extrahepatocellular mechanisms responsible for liver cell death, VIRCHOWS ARCHIV. B. CELL PATHOLOGY, 26(4),331-344, 1978.
32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R. J. :Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193,265-275, 1951.
33. Martin, J.P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. Arch. Biochem. Biophys., 255,329-336, 1987.
34. McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyperin(hemocuperin). J. Biol. Chem., 244,6049-6055, 1969.
35. Ohkawa, H., Ohishi, N. an Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction Anal. Biochem.,95,351-358, 1979
36. Pryor, W.A. : Free radical in biology ; Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicinal chemistry. Elsevier, Amsterdam, pp.331-361, 1977.
37. Seckin S., Kocak-Toker N., Uysal M., Oz B. : The role of lipid peroxidation and calcium in galactosamine induced toxicity in the rat liver, Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology, 80(1),117-120, 1993.
38. Topaloglu A.K., Goto M., Ravindranath T., Zeller W.P. : Galactosamine alters glucose regulation in ten-day-old rats treated with a low dose of endotoxin, RES. COMMUN. MOL. PATHOL. PHARMACOL, 91(3),297-302, 1996.