

利肝分水散이 Galactosamine에 의해 誘發된 白鼠 肝機能損傷에 미치는 影響

金池洞·朴宣東

東國大學校 韓醫科大學 方劑學教室

〈초록〉 利肝分水散의 galactosamine에 의해 야기된 백서의 간손상에 대한 해독능을 측정하기 위하여 利肝分水散을 전처지한 후 시험관내에서 과산화지질의 생성 및 간장의 지질과산화물의 함량 및 간장에서 항산화방지제(SOD)의 활성에 미치는 영향, 시험관내에서 xanthine oxidase의 활성변화 및 간장조직의 xanthine oxidase의 형질변화를 측정하여 유의한 결과를 나타내었는데 이는 利肝分水散의 利尿作用을 통한 독성물질의 배설을 촉진시킴으로서 세포나 조직의 손상 및 생체독성에 대하여 유의한 방어효능을 나타내는 것으로 이해할 수 있다.

중심 낱말 : 利肝分水散, galactosamine, 과산화지질, SOD

I. 서 론

利肝分水散은 『辨證奇聞』에 최초로 기재하고 있는데, 이 책은 清代 陳士澤이 기술한 14권의 종합의서로 1687년에 刊行된 『辨證錄』을 清代의 錢松이 본서를 10卷本으로 算定하여 改名한 것이다.¹⁾

『辨證奇聞』은 각각의 症狀에 病狀, 病因, 立法處方 및 方劑配伍를 상세히 서술했는데, 이론에 따른 설명이 분명하여 이해하기 쉽고, 症狀의 분석이 간결하고 또한 약의 쓰임새가 적절하여 질병에 부합되게 하였으며, 경험담이 풍부하여 높은 임상가치가 있으므로 刻本이 속출하게 되었다. 인체 각 부위의 病因을 주로 五行相生相剋의 원리에 근거하여 五臟六腑内の 病徵所在을 나타낸 것이 특징이라 하겠다.²⁾

본처방은 이 책의 五癩門에 나오며 肝氣가 鬱結하고, 濕熱이 結聚不散하여 생긴 兩目眞黃,

身體四肢黃色을 치료하는데 이는 五癩중 肝癩에 속한다. 그리고, 眼黃이 심한 것은 氣逆 때문이라고 설명하고, 이에 따른 症狀으로는 手足이 冷하고 汗出이 그치지 않으나, 단지 腰以上에 한정되고 腰以下에는 無汗하다고 하였다.³⁾

본처방의 약물은 茯苓, 甘藷, 茵陳, 豬苓, 車前子, 白茯苓, 草龍膽, 柴胡로 구성되며, 약물의 특징에 따라 분석해 보면 肝氣의 鬱結을 開發하게 하고, 濕熱을 分散하는 약물로서 輔佐하게 함으로써 黃疸을 치료하도록 도모하고 있다.⁴⁾

처방의 구성을 살펴보면 『金匱要略』의 茵陳五苓散⁵⁾, 『雜病源流犀燭』의 柴苓湯⁶⁾, 『蘭室秘藏』의 龍膽瀉肝湯⁷⁾, 『張氏醫通』의 白茯苓散⁸⁾과 최근의 生肝湯과 유사함을 찾을 수 있으며, 이들 처방은 간질환에 대한 한방치료제로 널리 활용되며, 또한 실험적 연구보고에서 黃疸과 肝炎, 肝硬變證에서 有意性이 있다고 지적하였다.^{14,15,18-21)}

최근 한의학에서는 galactosamine에 의해 유

발된 간기능손상에 미치는 처방에 관한 보고가 많은데 朴¹⁶⁾은 茵陳四苓散을, 郭¹⁷⁾은 胃苓湯 및 茵陳五苓散을, 李¹⁸⁾는 生肝湯을 보고하였는데 특히 朴¹⁶⁾은 艾炙 자극에 대한 영향을 보고하였다. 그러나, 利肝分水散에 대한 보고는 보이지 않았다.

따라서, 저자는 한의학적으로 肝의 疏泄作用을 증가시키고 또한 病的으로 발생된 濕熱을 清利 시킴으로서 간기능을 향상시키는 利肝分水散이 galactosamine에 의해 유발된 白鼠의 실험적 간기능손상에 대하여 有意할 것으로 기대되어 실험한 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 부속 한방병원에서 매입한 후 정선하여 사용하였으며, 한 첩의 분량은 다음과 같다.

利肝分水散

白茯苓	Poria Cocos Wolf	18.75g
甘菊	Polyporus Umbellatus	9.37g
茵陳	Semen Plantaginis	9.37g
豬苓	Herba Artemisiae Capillaris	9.37g
車前子	Flolos Chrysanthemi	9.37g
白茯苓	Frutus Tribuli	5.62g
龍膽草	Radix Gentianae	3.75g
柴胡	Radix Bupleuri	1.87g
總量		67.47g

2) 시약

Hypoxanthine, potassium phosphate는 Wako pure Chemical CO.로부터, bovine serum albumin, ferrous chloride, nicotineamide adenine dinucleotide, thiobarbituric acid sodium salt, xanthine oxidase, xanthine sodium salt, trichloroacetic acid 및 malondialdehyde는 Sigma CO.로

부터 매입한 제품을 사용하였고 그 외의 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

3) 동물

실험에 사용한 동물은 일정한 온도와 습도가 유지되는 조건으로 사육한 외관상 건강하고 체중이 200±20g 내외의 sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 실험동물은 실험전 16시간동안 물만 주고 절식시켰다.

2. 실험방법

1) 검액의 조제

利肝分水散 674.7g을 round flask에 증류수 2000ml와 함께 넣은 뒤 heating mantle에서 3 시간동안 가열 추출한 후, 여과한 후 감압 농축하여 농축액을 냉동 건조기에서 완전히 건조시켜 추출물 80.96g을 얻어 사용하였다.

2) 실험동물의 처치

정상군은 15일간 생리식염수만 복강주사하였고, 실험군은 利肝分水散 추출물을 실험동물의 체중 kg당 200mg을 1일 1회 15일간 경구투여 하였으며, 대조군은 동량의 생리식염수를 투여한 후 모두 15일째 galactosamine을 kg당 800mg씩 1회 복강주사하여 간독성을 유발하여 16시간 후에 희생시켰다.

3) 효소원 조제

Glass cage 내에서 ether를 사용하여 흡인마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후 채혈하고 간장을 적출하였다. 간장 조직은 1g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer로 약함)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액을 이용하여 과산화지질의 함량을 측정하였다. 마쇄균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상층액을 얻고, 이것을 다시 10000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 제거하였다. 한편, mitochondrial fraction을 제거시킨 상층액을 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 보다 더 순수한 가용성 분획을 분리하였다.

이 분획을 xanthine oxidase 및 SOD 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0-4°C에서 행하였다.

4) 항산화효소(SOD) 활성측정

SOD활성측정은 Martin⁴⁰⁾ 등의 방법에 준해 실시하였다. 효소원 조제 방법에 따라 분리된 cytosolic fraction 에 EtOH : CHCl₃(5 : 3)용액 0.4 배량을 가하여 잘 혼합한 다음 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하여 SOD 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 반응액은 50 mM K.P. buffer(pH 7.5, EDTA 0.1mM 함유) 일정량에 5mM hematoxylin 과 용량을 달리한 효소액의 용량을 달리하여 첨가하고 최종반응액이 3.0ml가 되게 하였다. 이 반응액을 25°C에서 5분간 반응시킨 다음 560nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소활성을 산정하였다. 효소활성 단위(Unit)는 효소를 넣지않고 반응시킨 5mM 액의 흡광도 증가를 50% 억제하는 단백질의 양으로 산정하였다.

5) 과산화지질 함량측정

과산화지질 함량측정은 Ohkawa⁴⁰⁾ 등의 방법에 준해 간조직 균질액 일정량에 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가하여 95°C에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 붉은색의 TBA 반응물질을 n-Butanol : Pyridine (15 : 1)용액으로 이행시켜 532 nm의 파장에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 한편 *in vitro*에서의 과산화지질의 생성실험은 반응액에 500μM 의 Fe(II), xanthine/xanthine oxidase system을 첨가시켜 37°C에서 1시간 반응시킨 후 상기 실험조건과 동일하게 시행하여 과산화지질의 함량을 산정하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1g당 MDA의 양을 nmol로 나타내었다.

6) Xanthine oxidase 활성측정 및 형전환률

Xanthine oxidase (type O)활성측정은 Stirpe³⁹⁾ 등의 방법에 준해 0.1 M K.P. buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60μM 및 효소원을

첨가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 다음, 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 한편, xanthine dehydrogenase (type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD⁺ 100nM을 첨가하여 동일하게 반응시킨 다음, 측정하여 나온 활성도 (색미 type : type D+O)에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다.

한편, xanthine oxidase 의 형전환을 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase(type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 형전환 비율을 O/(O+D) 의 비로 산출하였다.

7) 단백질의 정량

단백질량의 정량은 Lowry³⁹⁾ 등의 방법에 준해 bovine serum albumine을 표준품으로하여 정량하였다. 한편, 실험 결과의 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 상호비교하여 관찰하였다.

III. 실험 성적

1. 시험관내에서 과산화지질의 생성에 미치는 영향

시험관내에서 지질의 과산화반응을 측정하는 반응액 중에서 利肝分水散 검액을 농도별로 첨가시킨다음 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 간조직 마쇄액으로부터 생성된 과산화지질의 함량의 변화는 [Table I]에 나타내었다.

[Table I]에서와 같이 利肝分水散 검액을 첨가시키지 않은 상태에서의 과산화지질의 함량은 11.37±0.83 nmole/g이었다. 1ml의 반응액 중에 0.2mg의 利肝分水散 검액을 첨가시킨 조

건에서는 과산화지질의 함량이 11.27 ± 0.61 nmole/g이며, 0.6ml를 첨가시켰을 때에는 9.32 ± 0.45 nmole/g이고, 1.0ml를 첨가시켰을 때는 과

산화지질의 생성량이 8.47 ± 0.64 nmole/g로서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소현상을 볼 수 있었다.[Fig 1]

Table 1. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the hepatic lipid peroxidation *in vitro*.

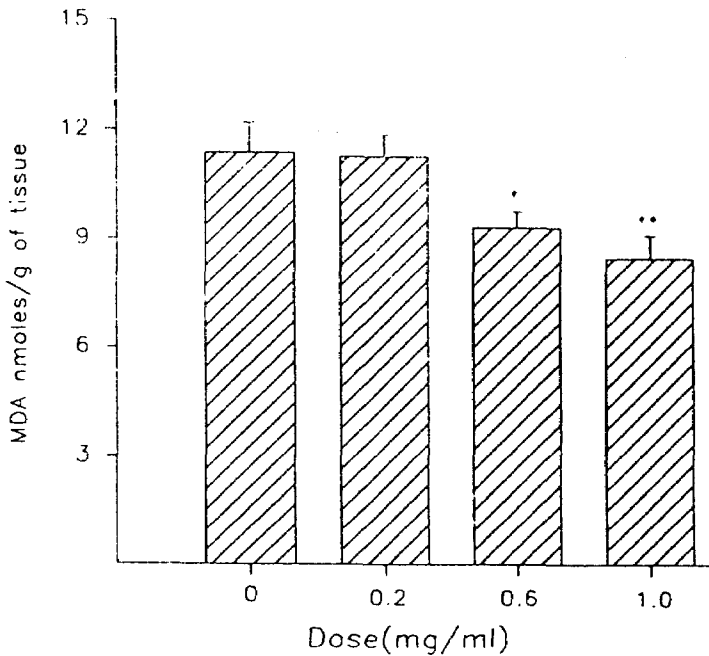
Dose(mg/ml)	MDA nmoles/g
0	11.37 ± 0.83
0.2	11.27 ± 0.61
0.6	9.32 ± 0.45 *
1.0	8.47 ± 0.64 **

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E for 3 separate experiments.

Significantly different from control (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

Fig 1. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the hepatic lipid peroxidation *in vitro*.



The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E for 3 separate experiments.

Significantly different from control(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

2. 간장의 지질과산화물 함량에 미치는 영향

간손상을 유발시키지 않은 정상상태에서의 간조직 중 과산화지질의 함량은 11.37 ± 0.83 nmole/g이었고, galactosamine으로 간손상을 유도한 대조군은 28.94 ± 2.35 nmole/g로서 정상군에 비해 약 2배 이상의 유의성 있는 증가를 관

찰할 수 있었다.

利肝分水散 검약을 전처치한 실험군의 경우 18.43 ± 1.41 nmole/g로 대조군에 비하여 유의성 있는 과산화지질의 감소현상이 관찰되었다.[Table II], [Fig 2]

Table II. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the hepatic content of lipid peroxide in galactosamine-treated rats.

Group	MDA nmoles/g
Normal	11.37 ± 0.83
Control	28.94 ± 2.35
Sample A	18.43 ± 1.41 **

The assay procedure was described in the experimental methods.

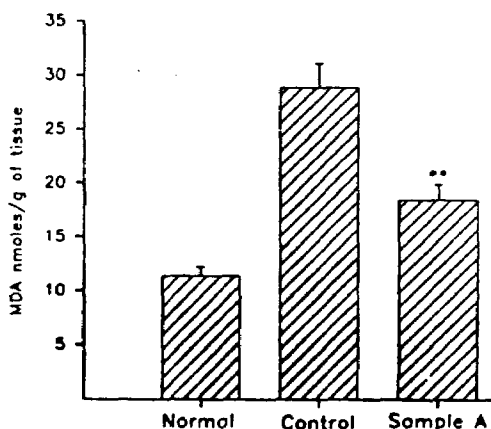
Values are mean \pm S.E for 5 animals.

Control : galactosamine-treated (800mg/kg, i.p)

Sample A : galactosamine-treated after the pretreatment with Leeganpunsusan for 15days

** : Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

Fig 2. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the hepatic content of lipid peroxide in galactosamine-treated rats.



The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E for 5 animals.

Control : galactosamine-treated (800mg/kg, i.p)

Sample A : galactosamine-treated after the pretreatment with Leeganpunsusan for 15days

** : Significantly different from control(** : $p < 0.01$)

3. 간장의 SOD 활성에 미치는 영향

정상군의 SOD 활성은 13.41 ± 1.26 unit/mg protein이었고, 대조군은 5.12 ± 0.53 unit/mg protein을 나타내어 정상군에 비하여 약 50% 정도 효소활성이 억제되었다.

利肝分水散을 전처치한 후 galactosamine을 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 10.47 ± 1.17 unit/mg protein로 효소 활성의 증가가 유의성있게 나타났다.[Table III], [Fig 3]

Table III. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the hepatic cytosolic superoxide dismutase activity in galactosamine-treated rats.

Group	Units/mg of protein
Normal	13.41 ± 1.26
Control	5.12 ± 0.53
Sample A	10.47 ± 1.17 **

The assay procedure was described in the experimental methods.

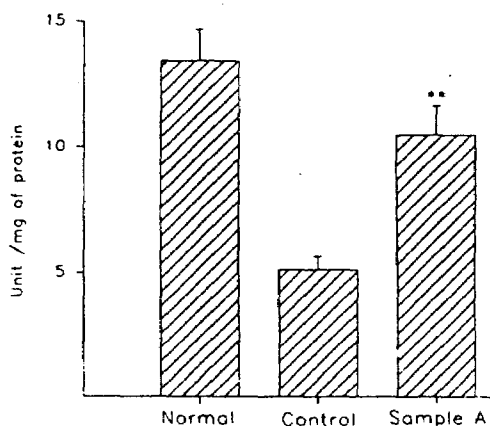
Values are mean \pm S.E for 5 animals.

control : galactosamine-treated (800mg/kg, i.p)

Sample A : galactosamine-treated after the pretreatment with Leeganpunsusan for 15days

** : Significantly different from control(** : $p < 0.01$)

Fig 3. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the hepatic cytosolic superoxide dismutase activity in galactosamine-treated rats.



The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E for 5 animals.

control : galactosamine-treated (0.5ml/kg, i.p)

Sample A : galactosamine-treated after the pretreatment with Leeganpunsusan for 15days

** : Significantly different from control(** : $p < 0.01$)

4. 시험관내에서 xanthine 산화효소의 활성변화에 미치는 영향

시험관내에서 利肝分水散 추출액의 첨가용량에 따른 간장조직의 xanthine 산화효소의 활성변화를 관찰하였다. 시험관내에 利肝分水散 추출액의 첨가용량을 달리하면서 xanthine 산화효소의 활성을 관찰하였을 때 type O의 경우 대조군의 활성이 0.32 nmole인데 비하여 利肝

分水散 추출물 첨가용량이 0.2mg/ml의 용량에서는 효소활성이 억제되었고, 0.6mg/ml에서는 0.23 nmole, 1.0mg/ml의 용량에서는 활성이 0.16 nmole로 대조군에 비하여 효소활성이 유의성있게 감소되었다. 그러나, type D+O의 경우는 효소활성이 대조치와 利肝分水散 추출액을 첨가한 경우에서 모두 유의성있는 변화를 관찰할 수 없었다. [Table IV], [Fig 4]

Table IV. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity in VITRO

Group Dose (mg/ml)	Specipic activity (nmole)	
	Type O	Type D+O
0	0.32± 0.04	1.12± 0.12
0.2	0.30± 0.04	1.12± 0.11
0.6	0.23± 0.03	1.12± 0.09
1.0	0.23± 0.03	1.12± 0.09 *

The assay procedure was described in the experimental methods.

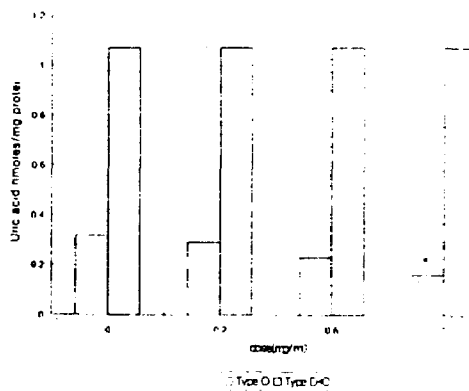
Values are mean ± S.E for 3 separate experiments.

* : Significantly different from control(* : p<0.05)

Type O : xanthine oxidase

Type D+O : xanthine oxidase + xanthine dehydrogenase

Fig 4. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity in vitro.



The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean + S.E for 3 separate experiments.

* : Significantly different from control(* : p<0.05)

Type O : xanthine oxidase

Type D+O : xanthine oxidase + xanthine dehydrogenase

5. 시험관내에서 간장조직의 xanthine 산화효소 형 전환 변화에 미치는 영향

시험관내에서 xanthine 산화효소의 형 전환율을 측정하는 반응액중에 농도를 달리하면서 利肝分水散 추출액을 첨가시키고 간장조직중의 xanthine 산화효소의 형 전환율을 관찰하였다.

시험관내에 利肝分水散 추출액의 첨가용량을 달리하면서 xanthine 산화효소의 type D부터

type O로의 형 전환율을 관찰하였을 때 대조치의 형 전환율이 30%인데 비하여 利肝分水散 추출액을 0.2mg/ml의 용량을 첨가시켰을 때는 27%, 0.6mg/ml를 첨가하였을 경우는 21%, 1.0mg/ml를 첨가한 경우는 15%로 나타나 利肝分水散 추출액의 첨가 농도에 의존적으로 xanthine 산화효소의 형 전환율을 억제시킴을 관찰하였다.[Table V], [Fig 5]

Table 5. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*.

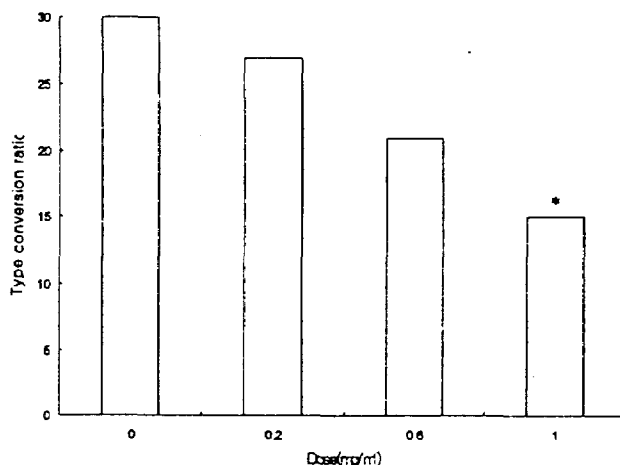
Dose(mg/ml)	Type conversion(%)
0	28.47 ± 1.02
0.2	26.69 ± 0.95
0.6	20.86 ± 1.45
1.0	14.23 ± 0.64 *

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean ± S.E for 3 separate experiments.

* : Significantly different from control(* : p<0.05)

Fig 5. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*.



The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean ± S.E for 3 separate experiments.

* : Significantly different from control(* : p<0.05)

6. 간조직에서 xanthine 산화효소 활성 및 형 전환 변화

실험동물에 利肝分水散 추출액을 15일간 경구 투여한 다음 간장을 적출하여 효소원을 제조한 후 xanthine oxidase 활성 및 형전환율의 변화를 관찰하였다.

간조직에서의 정상군의 효소활성은 0.32 nmole이었고 대조군의 효소활성은 0.53 nmole이었으나 Sample A는 0.39 nmole로 대조군에 비하여 27% 정도 억제되었다.[Table VI], [Fig 6]

간조직에서 xanthine 산화효소의 형전환율은 대조군의 40%에 비해 실험군은 31%로 형전환 저해효과가 나타났다.[Table VII], [Fig 7]

Table VI. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity in rats.

Group Dose (mg/ml)	Specific activity (nmole)	
	Type O	Type D+O
Normal	0.32± 0.05	1.13± 0.17
Control	0.53± 0.07	1.23± 0.30
Sample	0.39± 0.06	1.21± 0.18 *

The assay procedure was described in the experimental methods.

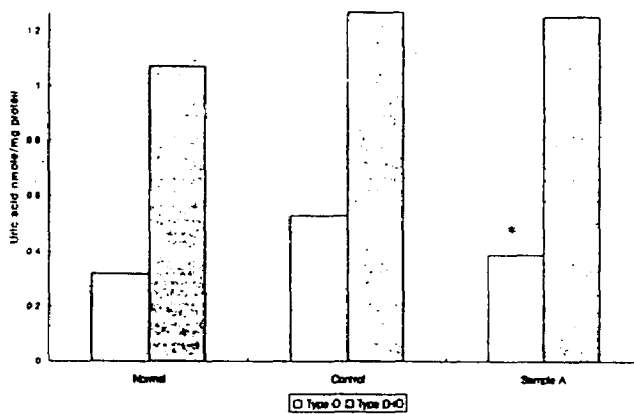
Values are mean± S.E for 5 animals.

* : Significantly different from control (* : p<0.05)

Type O : xanthine oxidase

Type D+O : xanthine oxidase+xanthine dehydrogenase

Fig 6. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity in rats.



The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean ± S.E for 5 animals.

* : Significantly different from control (* : p<0.05)

Type O : xanthine oxidase

Type D+O : xanthine oxidase+xanthine dehydrogenase

Table VII. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity in rats.

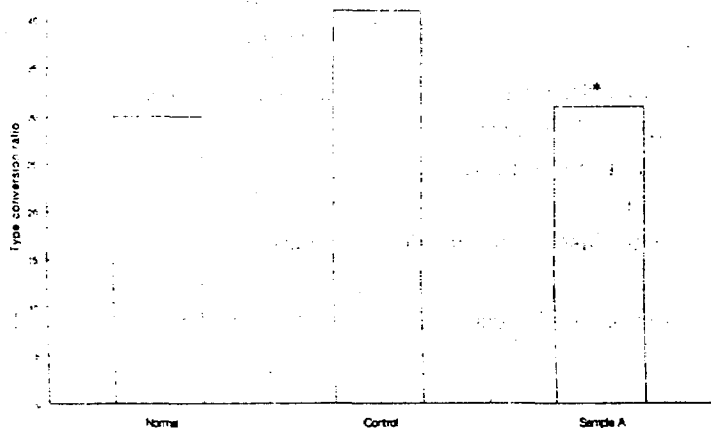
Group	type conversion(%)
Normal	30.57 ± 0.29
Control	40.78 ± 0.23
Sample	31.90 ± 0.33 *

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean ± S.E for 5 animals.

* : Significantly different from control(* : p<0.05)

Fig 7. Effect of the extract of Leeganpunsusan on the Hepatic xanthine oxidase activity in rats.



The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean ± S.E for 5 animals.

* : Significantly different from control(* : p<0.05)

IV. 고찰

약물의 독작용은 肝에서 약물의 대사장애나 배설장기인 腎臟에 독성물질이 축적되어 나타난다. 따라서, 해독은 일반적으로 해독작용을 담당하는 肝臟이 주도적인 역할을 하고, 腎臟과 膀胱이 이노작용을 통해 독성물질을 배설하는 것으로 알려져있다.⁹⁾ 한의학에서는 이러한 독작용의 대사장기로서 이노작용의 膀胱(腎)이 담

당하기도 하지만 실제로 脾, 肺, 腎, 三焦의 氣化作用이 전반적으로 담당하는 것으로 인식하고 있다. 따라서, 한의학적으로 肝의 疏泄作用을 증가시키고 또한 病的으로 발생된 濕熱을 腎의 氣化作用을 통해 滲利시킴으로서 약물로 인해 발생하는 독작용을 제거할 수 있을 것으로 생각된다.²⁾

利肝分水散의 구성을 보면, 利水滲濕藥인 白茯苓, 茵陳, 豬苓, 車前子와 清熱燥濕藥인 龍膽草,

發散風熱藥인 柴胡, 甘菊 그리고 平肝潛陽藥인 白茯苓로 구성되어 있다. 이들 약물들을 살펴보면, 우선 肝에 鬱滯된 濕熱을 淸解시키는 약물들인 龍膽草, 茵陳, 柴胡, 甘菊, 白茯苓가 구성 약물의 대부분을 차지하고 있음을 알 수 있으며 한편으로 수분대사에 관여하는 장기에 들어가 이뇨작용을 촉진시키는 몇가지가 포함되었다고 해석할 수 있다.¹⁴⁶⁾ 본 처방은 독성물질로 유발된 간손상에 대하여 肝의 疏泄作用을 강화시키고 아울러 膀胱의 氣化작용을 통해 이뇨작용을 촉진시킴으로서 해독효과를 나타낼 수 있는 중요한 처방임을 인식할 수 있다. 그러므로 실험적으로 유발된 간손상에 대한 有意한 결과를 도출할 것으로 사료되어 간손상과 연관된 아래의 지표를 사용하여 실험하였다.

Xanthine oxidase는 Aldehyde oxidase와 마찬가지로 생체 대부분의 조직 세포에 분포하고 있으며 세포의 가용성 분획에 주로 존재한다. 이 효소는 중심 금속이온으로서 몰리브덴을 함유하고 있으며 분자량이나 성상이 대단히 유사하며 생체내에서는 주로 산화반응을 촉매하는 것으로 알려져 있다.^{31,37,47,50)} 이 효소들에 의해서 산화반응이 진행되는 동안 분자상의 산소로부터 superoxide anion이나 hydroxyl radical 같은 활성산소류들이 생성되어 진다고 보고되어 있다. 이러한 활성산소류들은 세포막의 불포화지방산과 쉽게 반응하여 막의 과산화를 촉진시켜 독성을 초래하는 것으로 알려져 있다. Xanthine oxidase는 정상적인 생체내에 존재할 때 Type D (dehydrogenase형)로 존재하다가 단백 분해효소의 작용이나 허혈 상태 또는 병적 상태가 되면 Type O(Oxidase형)로 형전환이 이루어지며 이때 활성산소가 생성되어진다고 보고되고 있다.²⁹⁾

활성산소(Oxygen free radicals)는 생체가 산소를 이용하여 호흡반응을 하는 동안 체내에서 생성되는 중간대사산물로 Superoxide anion radical(O_2^-), Hydroxyl radical(OH), Hydrogen peroxidase(H_2O_2) 등이 알려져 있다.^{29,45)} 이들은 지질과 단백질로 구성된 세포막에 작용하여 불포화지방산을 과산화시켜 세포손상을 초래하는

강한 활성 물질로서²⁶⁾ Xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 등의 산소 작용에 의한 산화 반응에 의하여 생성이 촉진되어진다.⁴⁷⁾ 즉, 산소를 이용하는 생화학적 산화반응을 매개함으로써 지질의 과산화반응을 촉진하여 유기체 자신의 세포와 조직에 손상을 가하고 염증부위에서 활성화된 phagocyte로부터 유리되어 신체에 침입한 병원균을 죽이는 host dependence mechanism에 중요한 역할을 갖는다. 활성 산소는 세포막에서 지질의 과산화반응에 관여하므로서 과산화지질의 생성을 유도하여 당뇨병, 심장병, 신부전, 암 등의 질병을 유발하거나 노화를 촉진한다고 알려져 있다.^{22,29,36,52,56)}

과산화지질은 세포독성을 측정하는 Parameter의 하나로서 독성물질에 의해 간세포가 파괴되면 다량 생성되는데, 이는 세포막의 다가불포화 지방산이 반응성이 매우 큰 활성산소류들과 상호 연쇄적으로 반응하여 세포막이 파괴되기 때문에 생성되는 과산화물 구조를 가진 물질이다.^{30,32,46,53)} 이는 생리적으로 중요한 물질도 많지만 대체적으로 독성이 강하여 단백질성, 세포의 파괴와 기능손실, 조직손상을 초래할 뿐만 아니라 많은 질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.^{33,38,51,54,55)}

또, 활성산소는 생체내에서 과산화지질의 생성을 촉진시키는 일종의 유리기(free radical)로서 분해계를 통하여 독성이 경감되거나 또는 무독화되어지기도 하지만, 세포막의 다가불포화 지방산의 과산화반응을 유도하고 이들은 다시 인접 부위의 다가불포화 지방산의 과산화반응을 유도하여 또 다른 과산화지질을 생성케 하는 연쇄적인 반응이 지속되면서 조직손상과 기관의 퇴행성 변화를 가속화하는 것으로 알려져 있다. 의생물학 분야에서 활성산소는 과산화지질의 형성과 밀접하게 관련되어 있으며 세포에 매우 유독하고 암을 포함한 각종 난치질환의 병인, 약물을 포함한 여러 화합물에 의한 독성 및 생물학에서의 숙제인 Aging(노화)에 이르기까지 그 유발인자로서 깊이 관여하고 있음이 밝혀지고 있다.^{27,33,38,48)}

이와같이 생체조직의 손상 등 여러 질환의 원인이 되는 활성산소와 지질의 과산화물 조절 또는 감소시키는 주요한 내인성 산화방지제로 SOD(Superoxide dismutase)가 있다. 다시말하면 SOD는 대표적인 활성산소 분해효소이며 생물체에 치명적인 손상을 일으키는 활성산소를 제거시켜 생물체를 보호하는 일종의 방어효소⁴²⁾로서 이를 통한 노화기전의 규명, 각종 질환의 치료 및 예방법과 새로운 치료약물의 개발 등에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

SOD는 활성산소에 의해 야기되는 생체 독성에 대하여 방어메카니즘으로 작용하는 하나의 효소로 활성이 강한 Superoxide anion radical을 독성이 적은 Hydrogen peroxide로 대사시키고, 이 물질은 또 다른 대사과정을 통해서 독성이 없는 물질로 전환되어 배설된다.^{42,43)}

이들 간손상과 연관된 지표들을 사용하여 시험관내에서 지질의 과산화반응을 측정하는 반응액중에서 利肝分水散 검액을 농도별로 첨가시켰을 때, 利肝分水散 검액의 첨가농도 의존적으로 대조군에 비해 유의성 있는 감소현상을 볼 수 있었다.

간장의 지질과산화물 함량에 미치는 영향으로는 galactosamine으로 간손상을 유도한 대조군이 정상군에 비해 약 2배의 과산화지질함량을 보인 반면, 利肝分水散을 전처치한 실험군의 경우 대조군에 비하여 유의성 있는 과산화지질의 감소현상이 관찰되었다.

간장의 SOD 활성에 미치는 영향으로는 利肝分水散을 전처치한 후 galactosamine을 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 효소 활성의 증가를 나타내었다. 시험관내에서 利肝分水散 검액의 첨가용량에 따른 간장조직의 xanthine oxidase 산화효소 활성변화를 관찰하였을 때, type O의 경우 대조군의 활성이 0.32 nmole인데 비하여 利肝分水散 추출물 농도별로 첨가한 실험군에서는 첨가농도 의존적으로 효소활성이 유의성있게 감소되었다. 하지만, type D+O의 경우는 효소활성이 대조치와 利肝分水散 검액을 첨가한 경우에서 모두 유의성있는 변화를 관찰할

수 없었다.

시험관내에서 xanthine oxidase의 형전환율을 측정하는 반응액 중에 농도를 달리하면서 利肝分水散 추출액을 첨가시키고 간장조직 중의 xanthine oxidase의 형전환율을 관찰한 결과 利肝分水散 검액의 첨가 농도에 의존적으로 xanthine oxidase의 형전환을 억제시킴을 관찰하였다.

실험동물에 利肝分水散 검액을 15일간 경구 투여한 다음 간장을 적출하여 효소원을 제조한 후 xanthine oxidase 활성 및 형전환율의 변화를 관찰한 결과 간조직에서의 실험군은 대조군에 비하여 27% 정도 억제되었고 간조직에서 xanthine oxidase의 형전환율은 대조군의 40%에 비해 실험군은 31%로 형전환 저해효과가 나타났다.

이러한 사실로 보아 利肝分水散 중에 利水滲濕劑인 白茯苓, 猪苓, 茵陈, 車前子에 의한 이뇨작용과 茯苓의 健脾作用, 甘菊, 草龍膽, 柴胡, 白蒺藜로 구성된 疏肝解鬱, 清熱燥濕藥物들의 복합처방인 利肝分水散은 생체내에서 활성산소를 제거하는 SOD 활성을 촉진시켜 지질의 과산화반응을 억제하고, 이뇨작용을 통한 독성물질의 배설을 촉진시키므로서 세포나 조직의 손상 및 생체독성에 대하여 유의한 방어 효능을 나타내는 것으로 사료된다. 앞으로 본 처방이 지속적인 실험을 통하여 인체독성물질의 제거에 탁월한 효능을 가진 처방으로 규명되어 지길 기대한다.

V. 결 론

利肝分水散의 galactosamine에 의해 야기된 백서의 간손상에 대한 해독능을 측정하기 위하여 利肝分水散을 전처치한 후 시험관내에서 과산화지질의 생성 및 간장의 지질과산화물의 함량 및 간장에서 항산화방지제(SOD)의 활성에 미치는 영향, 시험관내에서 xanthine oxidase의 활성변화 및 간장조직의 xanthine oxidase의 형전환 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻

었다.

1. 시험관내에서 利肝分水散 검액을 지질과산화 반응을 측정하는 반응액 중에 농도별로 첨가 시킨 결과, 과산화지질의 함량이 대조군에 비해 첨가농도 의존적으로 유의성있는 억제 현상을 나타내었다.
2. 간조직중의 지질과산화물 함량에 있어 대조군에 비해 利肝分水散 검액을 전처리한 실험군에서 간조직의 과산화지질 감소현상이 나타났다.
3. 간조직의 항산화방지제(SOD) 활성에 있어 利肝分水散을 전처리한 후 galactosamine을 투여한 실험군에서 효소 활성의 증가를 나타내었다.
4. 시험관내에서 간조직 중의 xanthine oxidase의 활성변화는 Type O(xanthine oxidase)의 경우 실험군에서 첨가농도 의존적으로 유의성있게 감소되었다.
5. 시험관내에서 간조직 중의 xanthine oxidase의 활성변화는 Type D+O(xanthine oxidase+xanthine dehydrogenase)의 경우는 효소활성이 대조군과 利肝分水散 추출액을 첨가한 경우에서 모두 유의성있는 변화를 관찰할 수 없었다.
6. 시험관내에서 간조직의 xanthine oxidase의 Type D로부터 Type O로의 형전환율을 살펴 볼 때, 利肝分水散 추출액이 첨가농도 의존적으로 형전환율을 억제시켰다.
7. 시험관내에서 간조직에서 xanthine oxidase의 활성은 실험군이 대조군에 비하여 27% 정도 억제되었고, 형전환율은 대조군의 40%에 비해 실험군은 31%로 형전환 저해효과가 나타났다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 利肝分水散은 galactosamin으로 유발된 간손상에 예방효과가 있으며, 이는 항산화효소를 활성화 시키고 과산화지질을 감소시키며, xanthine oxidase의 활성과 형전환을 억제하는 약리작용으로 galactosamine의 대사가 촉진되어 생체내에서 유발될 수 있는 간독성을 경감시키는 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. 康秉秀, 金永坂 共編著: 臨床配合本草學, 서울, 永林社, pp.283-285, 480-482, 494-497, 540-543, 549-552, 556-558, 622-624, 1994.
2. 金完熙, 崔達永 共編: 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp.75-77, 141-143, 1993.
3. 申載鏞: 方藥合編解說, 서울, 成輔社, p.217, 1991.
4. 辛民教 編著: 本草學, 서울, 남산당, pp.250-252, 313-314, 532-533, 538-540, 584-585, 659-660, 1992.
5. 약리학강의: 홍사석, 이우주, 서울, 의학문화사, pp.66-68, 1993.
6. 全國韓醫科大學 本草學 敎授 共編著: 本草學, 서울, 永林社, pp.146-147, 149-150, 184-185, 302-305, 313-314, 518-519, 1991.
7. 韓醫學大辭典 編撰委員會: 韓醫學大辭典 醫史文獻編, 서울, 東洋醫學 研究所出版部, pp.73, 299, 1985.
8. 洪元植: 中國醫學史, 서울, 東洋醫學研究院, p.351, 1984.
9. 王其飛 外: 中國長壽學, 遼寧科學技術出版社, pp.50, 53-54, 1989.
10. 李東垣 撰: 東垣十種醫書 中 蘭室秘藏, 晝鬱, 大星文化社影印, pp.224-225, 1991.
11. 張璐 著: 張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, p.871, 1990.
12. 張仲景: 仲景全書, 서울, 大星文化社影印, pp.410-411, 1989.
13. 錢松: 辨證奇聞全書, 서울, 大星文化社影印, pp.3, 334-341, 1992.
14. 郭燮: 胃苓湯 및 茵陳五苓散이 galactosamine에 의한 白鼠의 肝損傷에 미치는 영향, 圓光大學校大學院, 碩士學位論文, 1993.
15. 金宇煥: 茵陳五苓散의 白鼠 肝病變에 대한 保護 및 回復作用, 圓光大學校大學院 博士學位論文, p.34, 1988.
16. 박영규: 艾灸刺戟이 D-Galactosamine 투여 白鼠 肝損傷에 미치는 影響, 圓光大學校 博

- 士學位論文, 1985.
17. 박형규 :茵陳四苓散이 急性 Acohol, 高脂肪食 및 Galactosamine 中毒 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1993.
 18. 安圭錫 : 柴苓湯이 Thioacetamide에 의한 白鼠 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院 博士學位論文, 1982.
 19. 安炳基 : 龍膽瀉肝湯과 溫化瀉肝湯의 抗炎症, 解熱, 鎮痛, 利水 및 抗菌效能, 慶熙大學校大學院 博士學位論文, 1980.
 20. 李昌圭 : 生肝湯이 cc4 및 d-galactosamin에 의하여 誘發된 實驗的 慢性 肝障害에 미치는 影響, 慶熙大學校大學院 碩士學位論文, 1986.
 21. 趙恒旭 : 茵陳五苓散(湯液)이 CCl₄ 中毒으로 인한 白鼠 肝損傷의 治療效果에 對한 實驗的 研究, 慶熙大學校大學院 碩士學位論文, 1972.
 22. 최진호 : 노화의 메카니즘과 연구방향, 생화학뉴스, 한국생화학회, 5(3) : pp.39-53, 1985.
 23. 徐敬才 等 : 龍膽瀉肝湯用驗, 四川中醫, 第4期, p.8, 1992.
 24. 羅春光 : 龍膽瀉肝湯活用, 上海中醫雜誌, 第11期, p.35, 1992.
 25. 梁惠英 外 : 龍膽瀉肝湯加減治療, 杏林中醫藥, 第17卷 第2期, p.32, 1997.
 26. 何石生 : 龍膽瀉肝湯加減治愈, 新中醫, 第7期, p.40, 1990.
 27. Babior, B. M., Kipnes, R. S. and curnutte, J. T., J. Biological defence mechanism, Clin. Inv., 52 : pp.741-744, 1973.
 28. Barry, H., Faseb. J., Oxidants and human disease ; some new concepts, 1 : pp.358-364, 1987.
 29. Batteli, N.G., Lornzoni, E. and Stirpe, F., Biochem. J. Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O(oxidase) : purification and interonversion and some properties, 131 : 191-198, 1973.
 30. Curtis, M. T., Gilfor, D. and Farber, J. L., Lipid peroxidation increses the molecular order of microsomal membranes., Arch. Biochem. Biophys., 235 : pp.664-649, 1984.
 31. Cutler, R.G. Antioxidants, aging and longevity. Free radicals in biology, Academic Press, Vol. 6, pp.371-424, 1984.
 32. David, R., J., Mechanistic toxicology : A radical perspective, Pharm. pharmacol., 41 : pp.505-511, 1989.
 33. Freemann, B. A. and Crapo, J. D., Biology of disease ; Free radicals and tissue injury, Lab. Invest., 47 : pp.412-426, 1982.
 34. Free Rad., Ward, P. A., Warren, J. S. and Johnson, K. J., Oxigen radicals, inflammation and tissue injury, Biol. Med., 5, 403-408, 1988.
 35. F. strip and E. Pella Corte, J. B. C. 244(14) : pp.3855-3563, 1969.
 36. Harman, D(ed. johnson, J. E. et al), Alan R., Free radical theory of aging : Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease processes. Free radicals, Aging and degenerative disease, Alan R. Liss. Inc., New York, pp.3-49, 1986.
 37. Kreintsky, T.A., Tuttle, J.V., Cattau, E.L. and Wang, P., A comparison of the distribution and eletron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase, Comp. Biochem. Physiol., 49B : pp.687-703, 1974.
 38. Larry, W. O. and Terry, B. O., Free radicals, aging and degenerative disease, Alan R. Liss Inc. pp.325-371, 1986.
 39. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr., and R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. biol. Chem. V 193, pp.265-267, 1951.
 40. Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E.,

- Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 255(2) : pp. 329-336, 1987.
41. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G. and Engel, P. C., The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoprotein with molecular oxygen, *Biochem. Biophys. Res. comm.*, 36 : pp.891-897, 1969.
 42. McCord, J. M. and Fridovich, I., Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuperin), *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055, 1976.
 43. McCord, J. M., Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase, *Science*, 185, 592-531, 1974.
 44. Milan, L. Jozef, R., Vilian, K., Peter, P. and Ladslav, V., Free radicals in chemistry and biology, CRC press, pp.29-31, 283, 1989.
 45. Nohl, H. and hegener, D., Do mitochondria produce oxygen radical in vivo?, *Eur. J. Biochem.* 82 : pp.191-198, 1973.
 46. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K., Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95 : pp.351-358, 1979.
 47. Parks, D.A. and Granger, D.N., Xanthine oxidase : biochemistry, distribution and physiology, *Acta physiol Scand.* 548, Suppl. pp. 87-99, 1986.
 48. Pryor, W. A., Stanly, T. P. and Blair, E., Autoxidation of polyunsaturated fatty acid (II), *Lipids*, 11 : pp.370-379, 1976.
 49. Pryor, W. A., Elsevier, Amsterdam., Free radical in biology : involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medical chemistry, pp.331-361, 1977.
 50. Rajagopalan, K.V., Fridovich, I. and Handler, P., Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties, *J. Biol. Chem.*, pp.237 : 922-928, 1981.
 51. Sharma, S. C., Mukhtar, H., Sharma, S. K. and Krishna Murt, C. R., Lipid peroxide formation in experimental inflammation, *Biochem. Pharmacol.*, 21, 1210-3346, 1982.
 52. Simmon, R. H., Scogging, R. M. and pattersen, D., Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals, *J. Biol. chem.*, 266 : pp.7181-7186, 1981.
 53. Suematsu, T. and abe, H., In Lipid peroxides in Biology and Medicine(Yaki, K., ed.), pp. 285-293, Academic Press, New york, 1982.
 54. Tappel, A. L., Lipid peroxidation damage to cell components. Federation Proceeding, 32, 1870-1974, 1973.
 55. Trush, A. M., Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E., Activation of pharmacologic agents to radical intermediates : Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 3335-3346, 1982.
 56. Ward, P. A., Warren, J. S. and Johnson, K. J., Oxygen radicals, inflammation and tissue injury, *Free rad. Biol. Med.*, 5 : 403-408, 1988.

=Abstract=

Effect of Leegapunsusan on galactosamine induced hepatotoxicity in rats

Ji-Hyoung Kim · Sun-Dong Park

Dept. of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk Univ.

The purpose of this study is to observe the protective effect of Leeganpunsusan on serum reaction and hepatic tissue in galactosamine treated rats.

In this study, the experimental rats divided three group(Normal, Control and sample group).

Under the same condition, normal and control groups were administered water, sample group was administered Leeganpunsusan for 15 days. The last day, both normal and control groups were injected to abdomen with galactosamine.

The rates of lipid peroxide, SOD(activity) and xanthine oxidase(activity) were measured.

The results were obtained as follows :

Effects of the extract of Leeganpunsusan on the hepatic lipid peroxidation, xanthine oxidase activity in VITRO, as compared with control group were significantly decreased with the level of concentration of extract prepared from Leeganpunsusan.

In VIVO, the hepatic content of lipid peroxide, the rate of type changing(type D to O) and xanthine oxidase activity were significantly decreased in galactosamine-treated rats.

Effect of on the hepatic cytosolic superoxide dismutase activity was significantly increased.

Key Word : Leeganpunsusan, galactosamine, lipid peroxide, SOD