

Oxidant에 의한 肝毒性유발에 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 效果

李樹行 · 金宇煥[†]

東義大學校 大學院 韓醫學科 脾系內科教室

Effect of Kamihaengche-tang(加味行滯湯) Plus Yukmijihwang-tang (六味地黄湯) on Oxidant-Induced Liver Cell Injury

Soo-Heing Lee and Woo-Hwan Kim[†]

Department of Oriental Medicine, Graduate School, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

This study was carried out to determine whether Kamihaengche-tang plus Yukmijihwang-tang (KCYH) exerts the protective effect against oxidant-induced liver cell injury. Cell injury was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) and alanine aminotransferase (ALT) release, and lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde, a product of lipid peroxidation in rabbit liver slices. H₂O₂ increased LDH release which was significantly prevented by 1% KCYHT. The protective effect of KCYH against H₂O₂-induced cell injury was dose-dependent in the range of 0.05-1% concentrations. Similarly, KCYH inhibited H₂O₂-induced lipid peroxidation in a dose-dependent manner. When liver tissues were exposed to Hg (0.5 mM), ALT activity in the medium and lipid peroxidation in tissues were markedly increased. These changes were prevented by 1% KCYH. KCYH restored Hg-induced inhibition of cellular GSH content.

These results indicate that KCYH exerts the protective effect against oxidant-induced liver cell injury, and this effect is attributed to prevention of lipid peroxidation. These effects may be due to an increase in concentration of endogenous antioxidants.

Key words : Kamihaengchetang plus Yukmijihwangtang, oxidant, liver cell injury, protective effect.

I. 緒 論

體陰而用陽이라 불리우는 肝의 生理는 機能活動面인 疎泄作用과 構造的面인 藏血機能을 가지고 있는 바, 肝陰과 肝陽사이의 平衡調和가 유지 될 때 정상적인 生理作用을 수행하지만 均衡이 깨어지면 不足 太過의 현상이 일어난다.

흔히 慢性肝疾患은 疎泄失調로 肝氣鬱結되어 木剋土의

病理變化로 肝脾不和 · 肝胃不和등이 나타나고, 藏血機能의 失調는 肝陰이 不足되어 肝腎相生 과 水生木의 理論대로 腎陰不足으로 나타날 수 있다^{1,2,3,4,5}.

반응성산소기들 (reactive free radicals)은 약물이나 방사선과 같은 外部要因에 의해서 發生되기도 하고, 人體內細胞의 정상적인 代謝過程 중에 발생도 하는 바, 이 들은 細胞膜의 이온전달물질이나 蛋白質 遺傳子 등을 공격하여

[†] Corresponding author

老化를 촉진 시키거나 癌의 발생, 肝損傷, 動脈硬化, 糖尿 등 여러 가지 疾病을 誘發시키는 因子로 알려지고 있다^{20,21,22}.

특히 肝은 糖·蛋白質·脂肪 代謝의 中樞機關이 되며 合成 및 分解 등의 매우 많은 代謝機能을 갖고 있으며 그 機能 대부분을 肝細胞에서 하고 있다⁶. 따라서 이들 代謝過程에서 發生되는 반응성산소기들을 제거하거나 이들의 毒性效果를 防止하는 것은 肝疾患의 豫防 및 治療에 중요한 指標가 될 것이다.

韓醫學에서 이와 관련된 研究는 單味劑로 尹⁷⁾ 등이 鹿茸 藥針製劑가, 複合劑로는 金⁸⁾ 등이 宣鬱通經湯으로 肝組織에 대한 抗酸化효과를 報告하였고, 蔣¹⁴⁾ 등은 六味地黃湯이 過酸化脂質의 含量을 低下시켜 老化를 抑制한다는 實驗報告가 있었지만, 肝脾腎 三臟의 併合方에 의한 抗酸化作用에 대한 實驗은 없었다.

이에 著者는 臨床家에 多用되고 있는 平肝健脾가 主效인 衰의 加味行滯湯⁹⁾과, 補腎陰이 主效인 六味地黃湯¹⁰⁾을 合方한 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 抗酸化效果에 미치는 영향을 確認해 보고자 家兔의 肝組織에 H₂O₂, Hg로 處理하여 alanine aminotransferase活性, 脂質의 過酸化 및 glutathione含量의 生化學的 變化를 比較 觀察하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

實驗에 사용한 動物은 體重 1.5-2.0kg 되는 成熟한 뉴질랜드產 白色家兔를 雌雄 구분없이 實驗 7日前에 大邱 Life science社에서 購入하여, 飼育室에서 固形飼料(小動物用, 東洋科學Co.)와 充分한 물을 자유롭게 攝取하도록 供給하고, 實驗室 環境에 1週日間 適應한 狀態에서 使用하였다.

2) 材料

東義大學校 附屬韓方病院에서 精選된 것을 使用하였으며, 處方은 加味行滯湯 合 六味地黃湯으로 處方內容은 《最新韓方臨床學》⁹⁾과 《方藥合編》¹⁰⁾에 기재된 내용을 따랐으며 各 藥物的 1貼 分量은 다음과 같다(Table 1, 2 參照).

Table 1. Prescription of Kamihaengche-tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
香附子	Cyperi Rhizoma	6
烏藥	Linderae Radix	4
蒼朮	Atractylis Rhizoma	4
厚朴	Magnoliae Cortex	4
陳皮	Deliciosa Perioapium	4
山查肉	Crataegi Fructus	4
神曲	Massa Medicata Fermentata	4
只角	Ponciri Fructus	4
川芎	Cidii Rhizoma	4
蘇葉	Perillae Folium	4
檳榔	Arecae Semen	3
木香	Costi Radix	3
藿香	Anisamelis Herba	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	3
茵陳	Artemisiae capillaris Herba	8
Total amount		62

Table 2. Prescription of Yukmijihwang-tang

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Rehmanniae Rhizoma	16
山藥	Dioscoreae Radix	8
山茱萸	Macrocarpi Fructus	8
牡丹皮	Moutan Cortex	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
白茯苓	Hoelen alba	6
Total amount		50

2. 方法

1) 藥物的 조제

加味行滯湯 合 六味地黃湯 各各 3貼 分量을 合한 總 336g을 粉末로 만들어 증류수 2ℓ속에 넣고 90℃에서 4時間 동안 熱湯한 후 여과지로 濾過하고 여과액을 rotary evaporator(Rikakikai Co. Japan)로 減壓 농축하였다. 최종 얻어진 분말은 약 20g이었으며, 適當한 농도로 생리식염수나 incubation용액내 녹여 使用하였다.

2) 肝組織 절편의 제작

체중 1.5-2.0 kg되는 토끼를 희생시킨 후 간장을 들어내

어 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 40 mM Tris-HCl (pH, 7.5)로 된 냉한 용액을 肝動脈內에 주입하여 血液을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome(Tomas Co. USA)으로 약 1cm³ 넓이와 약 0.3 - 0.5 mm 두께의 肝組織 切片을 만들어 사용하였다.

3) H₂O₂ 및 Hg의 처리

組織切片 약 50 mg을 4 ml의 incubation용액이 들어 있는 비커속에 넣고 Dubnoff metabolic shaker內에서 100 % 산소를 계속 供給하면서 37°C에서 incubation 하였다. 기본 incubation용액의 조성은 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 되어 있으며, H₂O₂나 Hg를 처리할 때는 이들 약물이 들어 있는 용액내에서 60분 동안 incubation하였다. Incubation후에 組織을 들어 내어 細胞의 損傷정도를 조사하기 위하여 lactate dehydrogenase (LDH) 나 alanine aminotransferase (ALT)의 流出를 測定하였으며, 또한 細胞損傷이 脂質의 過酸化와 연관이 있는 지는 그 生成物인 malondialdehyde (MDA)의 含量을 측정하여 평가하였다. 본 실험에서 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과를 조사할 때는 용액내에 적당한 농도로 녹여 사용하였다.

4) LDH 및 ALT의 측정

H₂O₂나 Hg로 처리된 肝組織 切片을 들어내어 증류수로 마쇄시켜 만든 組織 액과 incubation용액을 각각 50% 취하여 LDH 활성을 LDH측정 kit (Sigma Chemical)를 이용하여 측정하였으며, incubation용액내의 ALT活性은 ALT측정 kit (Sigma Chemical)를 사용하여 측정하였다.

5) MDA 含量 측정

肝組織내 MDA含量은 Uchiyama와 Mihara 방법²³⁾으로 측정하였는데, 간단히 설명하면, H₂O₂나 Hg로 처리된 肝組織切片을 차가운 1.15% KCl 용액 (5% wt/vol)속에서 파쇄하였다. 이 組織파쇄 균질액 0.5 ml에 1% 인산 용액 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 ml을 添加하여 끓는 물에서 45분간 加熱하였다. n-Butanol 4 ml을 첨가하여 완전히 섞은 다음 2000 g에서 20분간 원심분리한 후, 上層液의 흡광도를 536nm와 520 nm에서 測定하였다. MDA 값은 蛋白質 1 mg 당 nmoles로 표시하였다. 蛋白質濃度는 Bradford²⁴⁾의 방법으로 측정하였다.

6) Glutathione (GSH) 含量 측정

Glutathione (GSH) 含量은 Anderson의 방법²⁵⁾으로 측정하였다. 0.248 mg/ml NADPH (143 mM sodium phosphate, 6.3 mM Na₄-EDTA, pH 7.5를 함유하고 있는) 용액 700μl, 6 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 용액 100μl와 증류수 198μl를 cuvette에 넣어 30°C에서 15분간 데운후 試料 2μl를 넣고 섞은 다음 266 U/ml GSSG reductase 10μl를 첨가하여 412 nm에서 흡광도의 變化를 관찰하였고 단위는 μg/mg protein으로 나타내었다.

7) 統計處理

成績은 平均值±標準誤差로 나타내었으며, 평균치간의 有意性은 Student's *t*-test를 이용하여 검정하였고 p 값이 0.05미만일 때 有意한 것으로 判定하였다.

III. 實驗 成績

1. H₂O₂의 肝組織 損傷에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 영향

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 H₂O₂에 의한 肝組織損傷을 防止할 수 있는 지를 관찰하기 위하여 H₂O₂에 의한 LDH 流出에 대한 효과를 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 50 mM H₂O₂로 처리했을 때 LDH유출이 정상 3.52±0.459%에서 21.42±3.72%로 약 7배로 增加하였는데, 여기에 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액을 1% 농도로 첨가하였을 때 H₂O₂로 인해 증가되었던 LDH유출은 4.29±0.38%로 거의 정상 수준 까지 減少하였다. 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 抗酸化 효과가 농도변화에 따라 增加하는 지를 관찰하기 위하여 50 mM의 H₂O₂이 존재하는 용액내 0.05에서 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액을 첨가하여 LDH유출의 變化를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 LDH유출은 H₂O₂에 의해 유의하게 증가하였고 (2.96±0.39 대 20.49±1.59%), 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액이 첨가되었을 경우에는 추출액의 농도가 증가에 따라 LDH유출은 감소하여 1% 농도에서 3.96±2.97%로 정상 수준까지 減少하였다.

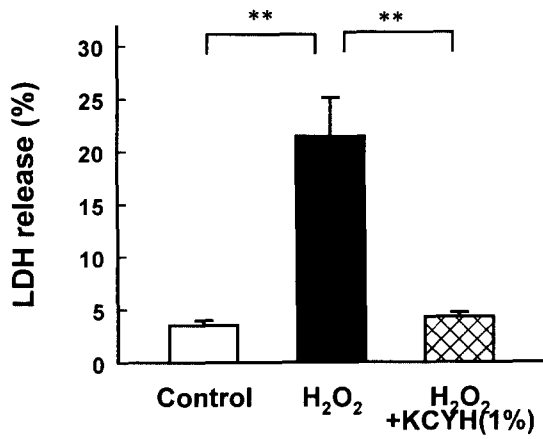


Fig. 1. Effect of KCYH on H₂O₂-induced LDH release in rabbit liver slices. LDH release was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of 50 mM H₂O₂, and 1% KCYH. Data are mean±SE of five determinations. **p<0.01.

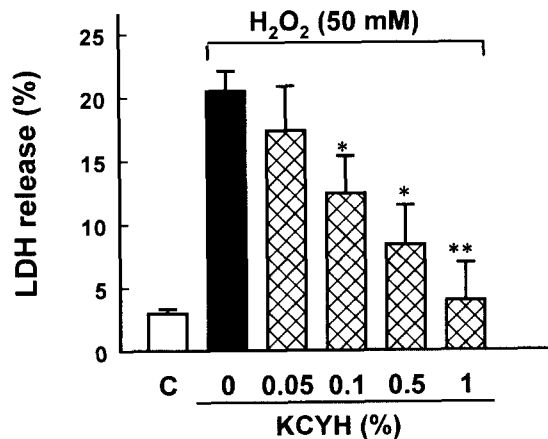


Fig. 2. Dose-dependency of the protective effect of KCYH against H₂O₂-induced LDH release in rabbit liver slices. LDH release was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of 50 mM H₂O₂ and various concentrations of KCYH. Data are mean±SE of five determinations. *p<0.05, **p<0.01.

2. H₂O₂에 의한 지질의 과산화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 效果

H₂O₂에 의한 肝組織의 損傷을 방지하는 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 效果가 脂質의 過酸化를 抑制하는 作用에 기인하는 지를 확인하기 위하여 H₂O₂에 脂質過酸化에 대한 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 效果를 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 50 mM H₂O₂를 처리했을 때 지질의 과산화는 196.48±21.44에서 897.38±45.39 pmole MDA/mg protein 현저하게 增加하였으며, 여기에 加味行滯湯 合 六味地黄湯을 0.05에서 1% 농도로 첨가했을 때 지질의 과산화는 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 濃도에 比例하여 減少되었다.

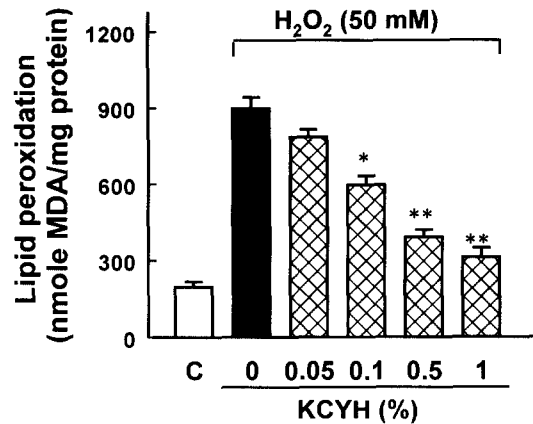


Fig. 3. Dose-dependency of the protective effect of KCYH against H₂O₂-induced lipid peroxidation in rabbit liver slices. Lipid peroxidation was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of 50 mM H₂O₂ and various concentrations of KCYH. Data are mean±SE of five determinations. *p<0.05, **p<0.01.

3. Hg에 의한 간조직 손상에 대한 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 效果

加味行滯湯 合 六味地黄湯이 oxidant뿐만 아니라 다른 毒性 物質에 의한 細胞損傷도 防止할 수 있는 지를 관찰하기 위하여 Hg에 의한 ALT流出에 대한 效果를 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 0.5 mM Hg로 처리했을 때

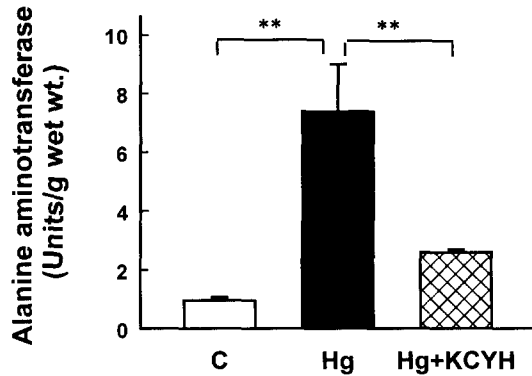


Fig. 4. Effect of KCYH on Hg-induced alanine aminotransferase (ALT) release in rabbit liver slices. ALT activity was measured in the medium in which tissues were incubated for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.5 mM Hg and 1% KCYH. Data are mean±SE of five determinations. **p<0.01.

incubation용액내의 ALT활성이 0.96±0.11에서 7.39±1.63 units/g wet wt.로 약 7배 증가하였으며, 이러한 증가는 1% 加味行滯湯 合 六味地黄湯에 의해 2.58±0.12 units/g wet wt.로 현저하게 減少하였다.

4. 간조직에서 Hg에 의한 지질의 과산화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 효과

加味行滯湯 合 六味地黄湯이 Hg에 의한 肝組織損傷을 防止하는 효과가 Hg에 의한 脂質의 過酸化를 防止함으로써 나타내었다는 것을 확인하기 위한 實驗을 하여 Fig. 5에 나타내었다. Hg은 脂質의 過酸化를 현저하게 增加시킴으로써 이 藥物이 oxidant들과 마찬가지로 脂質의 過酸化를 유발하여 細胞損傷을 초래하고 있음을 알 수가 있었는데, 肝組織에 Hg를 0.5 mM 농도로 處理했을 때 脂質의 過酸化는 198.45±28.53에서 886.93±29.48 pmole MDA/mg protein으로 약 5배정도 증가하였다. Hg를 처리할 때 加味行滯湯 合 六味地黄湯을 1% 添加했을 경우 Hg에 의해 증가되었던 脂質의 過酸化는 294.37±21.92 pmole MDA/mg protein로 거의 정상 수준까지 감소하였다.

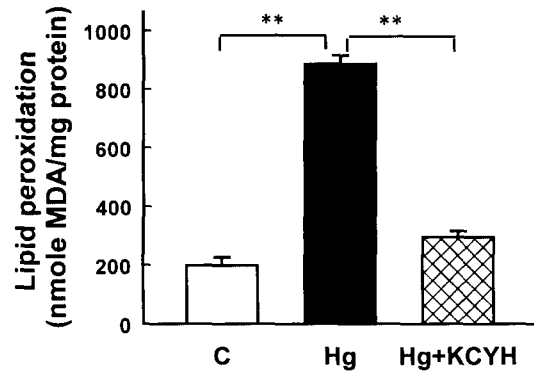


Fig. 5. Effect of KCYH on Hg-induced lipid peroxidation in rabbit liver slices. Lipid peroxidation was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of 0.5 mM Hg and 1% KCYH. Data are mean±SE of five determinations. **p<0.01.

5. 정상조직 및 Hg로 처리된 조직에서 glutathione (GSH)함량에 대한 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 효과

GSH는 여러 毒性物質에 의한 細胞損傷을 防止하는 解毒效果를 나타낼 뿐만 아니라, 細胞내 존재하는 抗酸化劑 역할을 하고 있는 物質이다^{18,19)}. 따라서 加味行滯湯 合 六味地黄湯이 Hg에 의한 細胞損傷을 防止하는 작용이 細胞내 GSH의 농도를 變化시켜 나타나는 것을 確認하기 위하여 정상조직과 0.5 mM Hg 處理한 組織에서 GSH 濃度 變化에 대한 加味行滯湯 合 六味地黄湯의 효과를 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 Hg를 처리한 조직에서 GSH농도가 0.30±0.02에서 0.14±0.02 μmole/g wet wt.로 유의하게 減少하였고, 1% 加味行滯湯 合 六味地黄湯를 첨가한 경우 GSH濃도가 1.51±0.25 μmole/g wet wt.로 현저하게 增加되었다.

IV. 考 察

韓醫學에서 肝의 主된 生理機能은 疎泄과 藏血 두가지로 大別 될 수 있다. 疎泄이란 氣의 昇降出入運動, 情志活動, 膽汁分泌, 脾胃의 消化機能 促進, 血과 津液의 運行과 輸布를 주로 하는 肝의 機能活動面에 인식되어 肝氣·肝陽으로 표현되고, 藏血은 血을 貯藏하고 血量을 調節하는 肝의 構造的인 面에 인식되어 肝血·肝陰으로 표현되므로 生理的

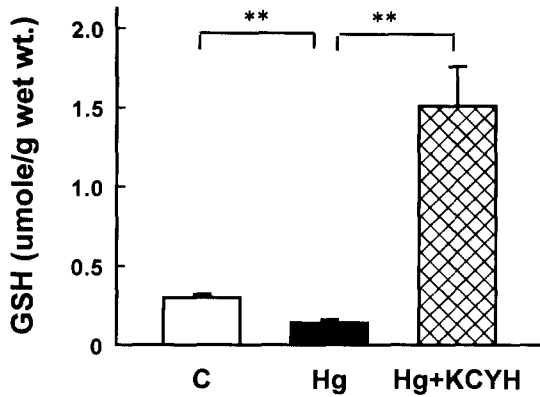


Fig. 6. Effect of KCYH on glutathione (GSH) content in Hg-treated liver slices. GSH content was measured in tissues incubated for 60 min at 37°C in the presence or absence of 0.5 mM Hg and 1% KCYH. Data are mean±SE of five determinations. **p<0.01.

으로 肝을 體陰而用陽이라 한다.

肝의 疎泄機能이 失調되면 木剋土의 病理變化로 “肝氣犯脾·肝氣犯胃”하여 脇肋脹滿, 脘腹脹痛 등 “肝脾不和·肝胃不和”의 臨床症勢가 나타난다.

反對로 脾胃의 濕熱이 壅滯되면 肝의 疎泄機能에 영향을 미쳐 脇肋脹滿, 黃疸 등이 發生하는데 이는 土壅木鬱한 所致이다.

또 脾失健運으로 血液의 化源이 不足하여도 失血이 誘發되어 肝血虛가 되므로 肝脾生理의 病理學的變化에 있어서 그 治療法則도 疎肝뿐 만 아 니라 健脾和胃의 合治가 必要하다^{1,2,4,5,15)}.

肝의 藏血機能은 腎藏精과 有關한데, 肝血은 腎精의 滋養을 받아 正常的인 肝의 機能을 維持하고, 腎精은 肝血의 不斷한 化生으로 因해 充滿케 되는데 이런 精과 血이 서로 滋生하고 傳化하는 關係를 “精血同源·肝腎相生”이라 說明한다. 그러므로 腎精이 虧損되면 肝血不足이 일어나고, 肝血不足은 腎精의 虧損을 초래하게 된다^{1,2,4,5,15)}.

肝陰과 腎陰의 病理에 있어서도 腎陰이 不足하면 水生木 하지 못해 肝失所養으로 肝陽이 偏亢되어 眩暈, 頭痛, 急躁易怒 등의 症狀이 나타나며, 反對로 肝火가 太盛하면 腎陰에 損傷을 미쳐 頭暈, 耳鳴, 咽乾口燥 등의 腎陰不足의 病

症이 形成되며, 그 腎陰不足은 養肝을 하지못해 肝陰不足을 誘發하게 된다⁴⁾.

이와 같이, 肝陰은 腎陰으로 부터 도움을 받아 得常하게 되는데 恒常 不足되기 쉬우므로 助養되어져야 하며, 肝陰이 充實할 때 肝陽은 太過하지 않게 된다¹⁾. 그러므로 그 治療에 있어서도 “肝腎相生·虛則補其母”의 理論대로 補腎陰의 併治가 必要하다.

臨床의으로도 慢性肝疾患은 肝脾不和·肝胃不和·肝腎不足 등의 病症으로 나타나므로 用藥에 있어서도 相生相勉의 理論대로 平肝健脾·滋補肝腎의 治法으로 處方이 構成되어야 適合하다.

이런 觀點에서 消導 行氣 利膽 疎肝의 效로 平肝健脾 시키는 加味行滯湯⁹⁾과 補腎陰의 效로 補肝陰 할수 있는 六味地黄湯¹⁰⁾의 合方은 慢性肝疾患에 適合한 處方이라 생각된다.

반응성산소기들 (reactive free radicals)은 약물이나 방사선과 같은 外部要因에 의해서 發生되기도 하고, 體內細胞의 정상적인 代謝過程 중에 발생도 하는 바, 이 들은 細胞膜의 이온전달물질이나 단백질 유전자 등을 공격하여 老화를 촉진 시키거나 癌의 발생, 肝損傷, 動脈硬化, 糖尿 등 여러가지 疾病을 誘發시키는 因子로 알려져 있다^{20,22)}. 그래서 이들의 毒性效果를 防止하기 爲한 方法을 찾는데 많은 努力을 기울이고 있다. 이런 努力의 一環으로 최근에 有害酸素를 제거 할 수 있는 天然產 이나 合成된 抗酸化劑의 개발에 많은 관심이 集中되고 있으나 지금까지 滿足한 成果를 얻지 못하고 있는 실정이다^{28,29)}.

우리 몸의 細胞속에는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 反應성산소기들을 分解하는 酵素들을 가지고 있을 뿐만아니라 glutathione과 같은 抗酸化劑 역할을 하는 물질을 가지고 있어 細胞의 정상적인 代謝過程중에 發生되는 反應성산소기들은 이들 酵素나 物質들에 의해 除去되고 있다. 그러나 그 發生되는 量이 많거나 抗酸化劑 역할을 하는 이들의 體內 濃도가 減少하게되면 細胞는 損傷을 받아 여러 가지 疾病을 유발시키는 原因이 될 것이다^{21,22)}.

특히 肝은 糖·蛋白質·脂質代謝의 中樞機關이 되고, 各營養素 維生素 鐵分 등을 저장하여 필요에 따라 供給한다. 그래서 人體內的 化學工場이라 일컬을 정도로 다양한 化學的 代謝作用을 하는데 그 機能 대부분을 肝細胞에서 하고

있다⁶⁾. 이들 代謝過程에서 發生되는 반응성산소기들을 제거하거나 이들의 毒性效果를 防止하는 것은 여러 가지 肝臟疾患의 豫防 및 治療에 중요한 指標가 될 것이다.

加味行滯湯은 現在 臨床家에서 多用되는, 裴가 作方하여 《最新臨床學》에 登載된 方⁹⁾으로 構成藥物의 效能을 살펴 보면, 香附子는 理氣解鬱, 烏藥은 順氣散寒, 蒼朮은 燥濕健脾, 厚朴은 行氣溫中, 陳皮는 理氣健脾, 山查肉은 消食行滯, 神曲은 消食和胃, 只角은 行氣消痞, 川芎은 活血行氣, 蘇葉은 行氣寬中, 檳榔은 理氣消積, 木香은 行氣消食, 藿香은 和中止嘔, 甘草는 調和諸藥, 茵陳은 清利濕熱 退黃의 效能^{11, 12)}이 있고, 六味地黃湯은 ‘小兒藥證直訣’에 최초로 登載된 方^{10, 13)}으로 그 構成藥物의 效能을 보면 熟地黃은 補血滋陰, 山藥은 補脾胃 益肺腎, 山茱萸는 補益肝腎, 牡丹皮는 清熱涼血, 澤瀉는 利水滲濕 泄熱, 白茯苓은 利水滲濕 健脾補中 한다^{11, 12)}.

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 반응성산소기들에 의한 肝細胞損傷에 어떤 效果를 가지고 있는 지를 조사하기 위하여 토끼의 肝組織 切片에 H_2O_2 또는 Hg를 處理하여 세포손상 정도는 lactate dehydrogenase (LDH) 유출 과 肝細胞內 酵素인 alanine aminotransferase (ALT) 활성을 측정하여 평가하였고, 산화제들이 세포손상을 일으키는 기전중의 하나는 脂質의 過酸化이기 때문에³⁰⁾ 脂質의 過酸化는 그 產物인 malondialdehyde (MDA)의 농도를 測定하여 評價하였다^{16, 17, 18)}.

本 實驗에서 H_2O_2 에 의해 LDH流出이 顯著히 증가하였는데 이러한 結果는 肝組織이 H_2O_2 에 의해 損傷되었다는 것을 意味하며, 이러한 경우에 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 效能을 조사한 結果, 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 抽出液을 添加했을 때 LDH流出은 有意한 減少를 보였다 (Fig. 1). 또 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 濃度變化에 따라 어떤 變化를 보이는 지를 調査하기 爲하여 0.05%에서 1%까지 變化시켜 觀察한 結果 0.1%에서 부터 有意한 減少를 나타내었다 (Fig. 2). 이러한 結果는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 H_2O_2 에 의한 肝組織의 損傷을 현저하게 防止하는 效果를 가지고 있음을 가르킨다.

또한 H_2O_2 에 의한 肝組織의 損傷을 방지하는 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 效果가 脂質의 過酸化를 抑制하는 작용에 기인하는 지를 확인하기 위하여 H_2O_2 에 脂質過酸化에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 效果를 조사하였다. 50mM H

$2O_2$ 를 處理했을 때 脂質의 過酸化가 현저히 增加하였고 0.05%에서 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 濃度變化시켜 觀察한 結果 濃度の 比例에 따라 漸次 減少되고 0.1%에서 有意한 減少를 보였다 (Fig. 3). 이로부터 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 肝組織에서 H_2O_2 와 같은 oxidant에 의한 脂質의 過酸化를 防止하고 있음을 알 수 있다.

그리고 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 oxidant뿐만 아니라 다른 毒性物質에 의한 細胞損傷도 防止할 수 있는 지를 관찰하기 위하여 Hg에 의한 ALT 流出 및 脂質의 過酸化에 대한 效果를 조사하였다. 0.5mM Hg로 處理했을 때 ALT 流出은 그 活性이 7배로 增加하였으나 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯에 의해 ALT流出은 有意하게 減少하였다 (Fig. 4). 또한 脂質의 過酸化도 顯著한 增加를 보였으나 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯에 의해 유의한 減少를 보였다 (Fig. 5). Hg가 細胞損傷을 誘發시키는 機轉은 反應성산소기를 發生시켜 細胞毒性을 나타내는 것으로 알려지고 있는데¹⁹⁾, 本 實驗에서도 肝組織에 Hg를 처리했을 때 脂質의 過酸化가 顯著하게 增加함으로써 이러한 理論을 뒷받침하였다. 따라서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 Hg에 의한 細胞損傷을 防止하는 效果가 脂質의 過酸化를 抑制하여 나타남을 알 수 있다.

細胞內에는 正常的으로 反應성산소기들을 除去하는 酵素나 物質을 가지고 있는데, 藥物이 직접 脂質의 過酸化를 防止하지 않더라도 이들 內在性 抗酸化酵素와 物質들의 活性이나 濃度を 증가시킨다면 細胞損傷을 防止할 수 있을 것이다.

glutathion (GSH)은 여러 毒性物質에 의한 細胞損傷을 防止하는 解毒效果를 가진 細胞內 存在하는 抗酸化劑 役割을 하고 있는 物質이다^{26, 27)}. 따라서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 Hg에 의한 細胞損傷을 防止하는 작용이 細胞內 GSH의 농도를 變化시켜 나타나는 지를 調査하였다. Hg를 處理한 조직에서는 GSH濃도가 有意하게 減少하였으나, 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 첨가한 경우 GSH濃도가 有意하게 增加시켰으며 그 增加 정도가 正常 細胞에서 測定된 含量보다 더욱 높게 나타났다 (Fig. 6).

以上の 實驗結果 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 效能이 oxidant에 의한 肝細胞 損傷과 Hg에 의한 肝細胞 毒性 및 脂質의 過酸化를 防止하고 있음을 알 수 있으며 內在性 抗酸化 物質인 GSH의 含量을 증대시키므로 抗酸化效果를 나

타내는 것으로 思料된다.

V. 結 論

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 oxidant에 의한 肝細胞損傷을 防止할 수 있는 지를 調査하기 爲하여 家兔 肝組織에 H₂O₂ 또는 Hg를 處理하여 細胞損傷을 誘發시킨 後 本湯을 投與 했던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. H₂O₂에 의한 LDH流出量이 有意性있게 減少되었다.
2. Hg에 의한 ALT流出量도 有意性있게 減少되었다.
3. H₂O₂ 및 Hg에 의한 脂質의 過酸化도 有意性있게 減少되었다.
4. Hg에 의한 glutathione (GSH)含量은 有意性있게 增加되었다.

以上の 結果로 보아 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 家兔의 肝細胞損傷을 防止하는 抗酸化效果가 認定되었다.

參 考 文 獻

1. 全國韓醫科大學肝系內科教授 共著：肝系內科學. 서울 東洋醫學研究院 pp.24-29,31-33 (1995).
2. 朴贊國：臟象學. 서울 成輔社 pp.181-185,214-215 (1992).
3. 柳基遠：脾胃臨床學. 서울 傳統醫學研究所 pp.52-53 (1993).
4. 杜鎬京：東醫腎系學(上). 서울 東洋醫學研究院 pp.32, 34 (1991).
5. 文濬典·安圭錫·崔昇勳：東醫病理學. 서울 高文社 pp.199,203,222-223 (1990).
6. 李文鎬 外：內科學(上). 서울 學林社 p.967 (1986).
7. 尹哲浩 外：“흰쥐의 肝 組織에서 鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化作用에 關한 研究”. 大韓韓醫學會誌 Vol. 17 (2) pp.191-202 (1996).
8. 金知夫：“宣鬱通經湯이 家兔의 肝組織 抗酸化效果에 미치는 影響”. 釜山 東義大學校 大學院 博士學位論文 (1998)
9. 裴元植：最新漢方臨床學. 서울 南山堂 pp.207,217-218 (1981).
10. 黃度淵：編註方藥合編. 서울 永林社 pp.133-134 (1991).
11. 辛民教：原色臨床本草學. 서울 永林社 pp. 171,176, 219, 243, 249, 250,252-253,380,384,386,387-388,394-395,413,415,421,424,519 (1991).
12. 金晷壽：標準本草學. 서울 進明出版社 pp.58,75,84, 140,143,177,204-205, 207,229,266,303,340, 343,361,367,397,427,460 (1975).
13. 康舜洙 外：方濟學. 서울 癸丑文化社 p.41 (1995).
14. 蔣瑩 外：“六味地黃湯 及其配伍對過氧化脂質 及 脂褐質含量的影響”. 中國中藥雜誌 第16卷 第3期 pp. 175-176.
15. 錢承輝·王廣其：中醫臟象學. 上海 上海中醫學院出版社 pp.154-155 (1987).
16. 金井 泉·金井正光：臨床檢査法提要. 서울 高文社 pp. 454,487,497 (1984).
17. 吉利 和：內科診斷學. 서울 第一醫學社 pp.467,494 (1992).
18. 織田敏次編著：肝腸病的 診斷學. 光州廣域市 瑞光醫學書林 p.975 (1995).
19. Yonaha, M. Ohbayashi, Y. Ichinose, T. and Sagai, M. : “Lipid peroxidation stimulated by mercuric chloride and its relation to the toxicity”. Chem Pharm Bull. 30, 1437-1442 (1982).
20. Floyd, R. A. : “Role of oxygen free radicals in calcinogenesis and brain ischemia”. Faseb J. 4, 2587-2597 (1990).
21. Reiter, R. J. : “Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain”. Faseb J. 9, 526-533 (1995).
22. Hallwell, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. E. : “Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now?”. J. Lab Clin. Med. 119, 598-620 (1992).
23. Uchiyama, M. and Mihara, M. : “Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test”. Anal Biochem. 86, 271-278 (1978).
24. Bradford, M. M. : “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding”. Anal Biochem. 72, 248-524 (1976).
25. Anderson, M. E. : “Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples”. Methods Enzymol. 113, 548-554 (1985).
26. Meister, A. and Anderson, M. E. : “Gutathione”. Annu Rev Biochem. 52, 711-760 (1983).
27. Starke, P. E. and Farber, J. L. : “Endogenous defence against the cytotoxicity of hydroge peroxide in cultured rat hepatocytes”. J. Biol Chem. 260, 86-92 (1985).
28. Greenwald, R. A. : “Therapeutic usages of oxygen radical scavengers in human diseases : myths and realities”. Free Radical Res Commun. 12-13, 531-538 (1991).
29. Downey, J. M. : “Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion”. Ann Rev Physiol. 52, 487-504 (1990).
30. Sies, H. : “Biochemistry of oxidant stress”. Angew Chem Int Ed. 25, 1058-1071 (1986).