

시호사물탕이 *t*-BHP로 유도된 간세포의 산화적 손상 및 자유기에 의한 지질과산화 반응에 미치는 영향

- 김태기¹, 박선동¹, 문진영² -

(¹동국대학교 한의과대학 방제학교실, ²경혈학교실)

- Abstract -

Preventive Effects of Sihosamultang Extract on Lipid Peroxidation by Free Radicals and Oxidative Damage of Hepatocytes by *tert*-Butyl Hydroperoxide

Tai-Gi Kim¹, Sun-Dong Park¹ and Jin-Young Moon²

¹Department of Prescription, ²Department of AM-Pointology,
College of Oriental Medicine, Dongguk University

Sihosamultang(SST) has been used for the treatment of puerperal fever, liver disease in traditional medicine. The present study was carried out to evaluate the antioxidant effects of SST extract *in vitro*. The inhibitory effect of SST extract on lipid peroxidation was examined in the linoleic acid autoxidation system. In this test, SST extract significantly inhibited the time course of the lipid peroxidation. And SST extract

extracts showed about 73% scavenging effect on DPPH radical. And this extract inhibited not only the lipid peroxide formation induced by hydroxyl radical derived from $H_2O_2-Fe^{2+}$ in the rat liver homogenate, but also the superoxide generation from xanthine-xanthine oxidase system in a dose-dependent manner. In addition, SST extract protected the hepatic cell death induced by *tert*-butyl hydroperoxide. These data indicated that SST might play a protective role against oxidative injury by free radicals.

Key words : Sihosamultang, lipid peroxidation, DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide, *tert*-butyl hydroperoxide

I. 서론

자유기(free radical)에 의한 세포막 인지질의 지질과산화 반응은 세포에 산화적 손상을 야기하는 주된 기전중의 하나이다. 생체내에서 자유기는 산소를 이용하는 정상적 대사과정 중의 부산물로 생성되어지므로 인체는 항상 자유기에 의한 산화적 손상의 기회에 노출되어 있다고 할 수 있으며, 특히 이 외에도 방사선 조사, 음주, 흡연, 약물 등의 외부적 요인에 의하여 자유기가 생성될 수 있다. 자유기는 세포내에서 효소 활성의 이상과 DNA 손상을 야기할 수 있으며, 특히 지질과산화 반응에 의한 세포막 파괴 및 세포괴사를 초래한다¹⁻²⁾.

따라서 간장 보호제와 관련한 연구에서도 자유기에 의한 간세포의 산화적 손상을 효과적으로 방어할 수 있는 약물의 검색이 중요시되고 있으며, 특히 한약을 대상으로 이루어진 최근의 연구 결과에 의하면 자유기에 의한 지질과산화 반응을 저해함으로써 산화적 손상을 예방하거나 최소화할 수 있는 수종의 약물들이 보고된 바 있다. 시호사물탕(柴胡四物湯)은 소시호탕(小柴胡湯)에 사물탕(四物湯)을 합방한 처방으로 소문병기기의보명집(素問病機氣宜保命集)에 “治產後日久虛勞, 雖日久而脈浮疾者, 宜服三元湯”이라 하였고, “如日久虛勞, 微有寒熱, 脈沈而虛者, 宜柴胡四物湯”이라하여 脈과 四時의 차이에 의거하여 小柴胡湯과 四物湯의 배합 용량을 조절하여 사용한다 하였으며³⁾, 동의보감(東醫寶鑑)에도 “產後發熱, 及熱入血室”의 치료에 사용한다고 수록되어 있다⁴⁾. 특히 시호사물탕은 한방 임상에서 肝中熱證, 肝虛熱證 및 肝傷瘀血證⁵⁾ 등과 같은 간장 질환의 치료에 다용되고 있다. 한편 시호사물탕에 관한 실험적 연구로는 CCl₄로 유발된 흰쥐의 간손상에 대한 영향을 혈청 중 효소 활성의 변화를 지표로 검토하여 본 처방이 간장 보호 효능을 나타낸다는 연구 결과가 보고된 바 있으며⁶⁾, 시호사물탕

의 구성 약물인 시호⁷⁻⁸⁾, 황금⁹⁾, 작약¹⁰⁻¹²⁾, 인삼¹³⁾, 당귀¹⁴⁻¹⁵⁾ 등에 대한 단방 약물 개개의 항산화 효과 및 간세포 보호 효과가 이미 보고된 바 있다. 그러나 본 처방의 자유기에 의한 지질과산화 반응에 대한 효과 및 간세포 보호 효과에 관한 구체적인 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 시호사물탕의 항산화 효능에 의한 간세포 보호효과를 검토하기 위하여 지질의 자동산화계, DPPH radical, Fenton 반응계, xanthine-xanthine oxidase 반응계를 이용하여 시호사물탕의 항산화 효과 및 자유기 소거능을 관찰함과 동시에 흰쥐의 정상 간세포를 이용하여 *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP)로 유도한 간세포의 산화적 손상에 대한 시호사물탕의 보호 효과를 검토하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 시호사물탕의 구성 약물인 시호(柴胡), 생지황(生地黃), 천궁(川芎), 적작약(赤芍藥), 당귀(當歸), 황금(黃芩), 인삼(人蔘), 반하(半夏), 감초(甘草), 생강(生薑)은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였고, 시호사물탕(Sihosamultang : SST)의 처방 구성은 동의보감에 준하였으며, 한 첩의 용량은 다음과 같다.

약재명	생 약 명	용량 (g)
시 호	Bupleuri Radix	8.0
생지황	Rehmanniae Radix	8.0
천 궁	Cnidii Rhizoma	4.0
적작약	Paeoniae Radix	4.0
당 귀	Angelicae gigantis Radix	4.0
황 금	Scutellariae Radix	4.0
인 삼	Ginseng Radix	2.0
반 하	Pinelliae Rhizoma	2.0
감 초	Glycyrrhizae Radix	2.0
생 강	Zingiberis Rhizoma	4.0
총 량		42.0

2) 세포 및 실험동물

본 실험에 사용한 흰쥐의 정상 간세포 (Ac2F)는 일본 HSRRB (Health Science Resources Bank, Osaka, Japan)로부터 분주 받아 使用하였다. 또한 본 실험에서 간조직 균질액의 조제를 위해 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대한 동물 실험 센터에서 구입하여 사용하였다.

3) 시약

본 실험에 사용된 시약으로서 linoleic acid, 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS), α, α -diphenyl- β -picryl hydrazyl(DPPH), *tert*-butyl hydroperoxide, (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT), Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), L-glutamine, butylated hydroxytoluene(BHT), 3-t-Butyl-4-Hydroxyanisole(BHA), hydrogen peroxide(H_2O_2)는 Sigma사 (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)로부터, 그리고 fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotic/antimycotics는 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.)로부터, malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)

는 Fluka사(Fluka Chemie AG,Switzerland)로부터,DL- α -Tocopherol, ferrous chloride ($FeCl_2$)는 Wako사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)로부터, trichloroaceticacid(TCA)는 Janssen Chimica(Belgium)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 검액의 제조

시호사물탕 8첩 분량(336g)을 취해 세절하여 냉각 환류관이 부착된 원저 플라스크에 넣고, 3배량의 증류수를 가한 다음, 3시간 동안 추출하고 여과하였다. 여액은 rotary evaporator로 감압농축한 다음, 동결건조기 중에서 건조하여 분말상의 시호사물탕 추출물 84.43g(수율 25.13%)을 얻었으며 이를 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용한 시호사물탕 추출물의 증거 표본은 동국대학교 한의과 대학 방제학교실에서 보관 중이다.

2) Linoleic acid의 자동산화 억제 효과 측정

(1) Linoleic acid 현탁액 조제

Linoleic acid 현탁액은 Osawa 등의 방법¹⁶⁾에 따라 제조하였다. 즉 linoleic acid 0.13ml, 99.0% ethanol 10ml, 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 10ml을 혼합하고, 시호사물탕 추출물 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume이 25ml가 되도록 조절하였다. 이 혼합액을 test tube에 넣고 40°C에서 배양하여 지질의 자동산화를 유도하였다.

(2) 지질과산화물의 함량 측정

배양 시간 경과별로 지질의 자동산화에 의한 과산화지질의 함량을 측정하기 위하여 본 실험에서는 Ohkawa 등의 방법¹⁷⁾에 의거하여 TBA법에 따라 정량하였다. 즉 40°C에서 배양시킨 linoleic acid 현탁액 50 μ l에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2ml, 20% acetic acid(pH 3.5, 10N NaOH) 1.5 ml, 0.8% TBA 수용액 1.5 ml을 넣고, 증류수로 이 혼합액의 total volume을 4ml로 조절한다. 다음, 5°C에서 60분간 방치하고, 다시 95°C에서 60분간 발색시킨 뒤, 흐르는 수돗물에서 냉각시켜 spectrophotometer (Gilford, ResponseTM, U.S.A)를 사용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 과산화지질의 함량은 malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)로 검량표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA μ M로 표기하였다.

3) DPPH radical 소거효과 측정

DPPH radical에 대한 시호사물탕의 소거효과를 알아보기 위하여 Hatano 등의 방법¹⁸⁾에 따라 다음의 실험을 실시하였다. 먼저 농도별 시호사물탕 추출물과 증류수의 혼합물 4ml을 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1ml와 혼합하여 잘 흔들어 준 다음, 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Fenton 반응계에서의 항산화 효과 측정

(1) 간조직 균질액 조제

흰쥐를 diethyl ether(Junsei Chem. Co., Japan)로 가볍게 마취한 다음, 복피를 절개하여 1.15% KCl 완충용액으로 2회 간문맥을 통하여 perfusion시킨 다음, 간을 적출하고, 다시 KCl 완충용액으로 여러번 세척한 후, 흡습지로 수분을 완전히 제거시키고 간 조직의 무게를 평량하였다. 적출한 간 조직을 빙냉상태에서 조직균질기(Teflon Plotter Elvehjem Homogenizer, Glas-Col, U.S.A.)를 사용하여 KCl 완충용액으로 20% (w/v%) 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 700 \times g에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 취하였으며, 실험에 사용할 때까지 -70°C에서 냉동보관하였다.

(2) Hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응에 대한 효과 측정

흰쥐 간조직 균질액에 10mM FeCl₂, 30mM H₂O₂ 및 농도별 시호사물탕 추출물이 첨가된 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)의 반응용액을 1ml로 하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, TBA법으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

5) Xanthine-XOD반응계에서 superoxide의 생성 억제 효과 측정

시호사물탕 추출물이 xanthine-XOD 반응계에서의 superoxide anion(O₂⁻) 생성 억제효과를 측정하기 위하여 다음과 같이 반응용액을 조제하였다. 먼저 250 μ M xanthine 0.5ml과 농도별 시호사물탕 추출물 0.1ml 및 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1.3ml을 함유하는 반응용액을 실온에서 3분간 정치한 다음, 0.1unit xanthine oxidase를 첨가하여, 반응용액의 총량을 2ml로 조절한 후, 290nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 본 실험의 결과는 xanthine-XOD 반응계에서 생성된 superoxide가 전자수용체로

작용하는 cytochrome c에 전자를 공여함으로써 발생하는 cytochrome c의 환원정도를 단위 시간당 흡광도의 변화로 측정하여 대조군에 대한 생성 억제효과(%)로 환산하여 표기하였다.

6) 세포배양계에서의 항산화작용 측정

(1) 세포배양

정상 간세포(Ac2F)를 10% FBS-DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75-cm² plastic flask(Corning Co., U.S.A)에서 subculture하여 세포주를 유지하였다.

(2) 농도별 시호사물탕의 세포독성 측정

정상 간세포(Ac2F)에 대한 시호사물탕 추출물의 세포독성을 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 배양 간세포를 5×10⁴cells/well이 되도록 넣고, 시호사물탕 추출물을 농도별로 희석하여 well당 200μl씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2ml로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 배양한 다음, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

(3) 항산화작용 측정

흰쥐의 정상 간세포에 *t*-BHP에 의한 산화적 손상 및 세포피사에 대한 시호사물탕 추출물의 세포보호 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 5×10⁴cells/well이 되도록 분주하고 농도별 시호사물탕 추출물을 well당 200μl씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2ml로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18시간 배양하였다. 그 후 CMF-PBS로 2회 세척하고 SFM을 well당 2ml씩 가하고, *t*-BHP의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

(4) MTT assay

세포 생존율의 측정을 위한 MTT assay는 Sladowski 등의 방법¹⁹⁾을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 96-well plate에 MTT를 총용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음, 90×g에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 상층 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 well당 600μl씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계적 처리

본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 그 결과 *p*값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

III. 실험결과

1. 지질자동산화 억제 효과

본 실험에서는 시호사물탕의 항산화효능을 규명하기 위한 일환으로 불포화지방산의 일종인 linoleic acid 자동산화계를 이용하여 농도별 시호사물탕 추출물의 지질과산화물 생성 억제 효과를 배양 시간별로 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서의 지질과산화물의 함량은 배양 1일째 1.69 μM이었으나, 시간이 경과함에 따라 점점 증가하여 배양 11일째에는 43.46 μM로 현저한 증가를 보였다. 한편, 항산화제인 1% BHT, BHA 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서는 배양 11일째에 각각 1.19, 1.36, 9.58 μM로 대조군의 43.46 μM에 비해 지질과산화물의 생성이 현저하게 억제되었다. 그리고 시호사물

탕 추출물을 농도별로 8,000, 4,000, 2,000, 1,000, 800 μ g을 첨가한 실험군에서는 배양 11일째의 지질과산화물의 함량이 각각 1.31, 1.51, 1.62, 2.96, 4.71 μ M로 대조군에 비해 linoleic acid의 자동산화를 강하게 억제되었다. 이 결과에서 시호사물탕의 항산화력은 기존의 항산화제인 BHT 및 BHA와 유사한 수

준이었으며, 특히 tocopherol 보다 오히려 강한 항산화력을 보였다. 또한 시호사물탕 추출물을 농도별로 400, 200, 100, 50 μ g을 첨가한 실험군에서도 배양 11일째 지질과산화물의 함량이 각각 22.49, 29.72, 37.00, 36.21 μ M로 대조군의 43.46 μ M에 비해 지질과산화물의 생성이 억제되었다(Table II).

Table II. Antioxidative Activity of Sihosamultang in the Linoleic Acid System

Groups	Incubation time (day)					
	1	3	5	7	9	11
Control	1.69 \pm 0.08 ^{a)}	3.47 \pm 0.15	13.95 \pm 0.55	18.12 \pm 0.48	23.58 \pm 0.81	43.46 \pm 2.88
BHT	0.82 \pm 0.03	0.87 \pm 0.01	0.89 \pm 0.02	0.97 \pm 0.02	1.18 \pm 0.03	1.19 \pm 0.04
BHA	0.84 \pm 0.01	0.88 \pm 0.03	0.91 \pm 0.03	0.95 \pm 0.02	0.99 \pm 0.02	1.36 \pm 0.04
Tocopherol	0.95 \pm 0.02	0.97 \pm 0.02	1.04 \pm 0.04	1.08 \pm 0.02	1.26 \pm 0.02	9.58 \pm 1.14
SST (μ g)						
8,000	0.98 \pm 0.01	1.01 \pm 0.04	1.15 \pm 0.00	1.17 \pm 0.03	1.25 \pm 0.10	1.31 \pm 0.03
4,000	0.95 \pm 0.02	1.01 \pm 0.02	1.04 \pm 0.02	1.17 \pm 0.02	1.39 \pm 0.22	1.51 \pm 0.13
2,000	0.97 \pm 0.04	0.98 \pm 0.01	1.06 \pm 0.02	1.26 \pm 0.01	1.42 \pm 0.18	1.62 \pm 0.08
1,000	0.98 \pm 0.01	1.08 \pm 0.02	1.09 \pm 0.00	1.28 \pm 0.03	1.31 \pm 0.01	2.96 \pm 0.72
800	1.17 \pm 0.04	1.17 \pm 0.03	1.22 \pm 0.00	1.34 \pm 0.03	1.73 \pm 0.09	4.71 \pm 0.47
400	1.20 \pm 0.01	1.24 \pm 0.02	2.48 \pm 0.00	3.91 \pm 0.51	6.45 \pm 0.07	22.49 \pm 0.77
200	1.40 \pm 0.05	1.45 \pm 0.07	4.85 \pm 0.49	6.72 \pm 1.23	13.70 \pm 0.33	29.72 \pm 0.18
100	1.51 \pm 0.02	1.56 \pm 0.01	9.02 \pm 0.82	13.20 \pm 0.95	17.58 \pm 0.10	37.00 \pm 0.10
50	1.53 \pm 0.06	1.82 \pm 0.02	9.27 \pm 0.62	16.09 \pm 0.94	21.34 \pm 0.49	36.21 \pm 1.65

At intervals during autoxidation of linoleic acid in the water-alcohol system, the degree of oxidation was measured by the TBA method. The reaction mixture contained 50 μ l of sample, 0.2ml of 8.1% sodium dodecylsulfate(SDS), 1.5ml of 20% acetic acid solution(pH 3.5), and 1.5ml of 0.8% aqueous solution of TBA. The pH of 20% acetic acid solution was adjusted with 10N NaOH. The mixture was finally made up to 4.0ml with distilled water, and placed at 5°C for 60min, and then heated at 95°C for 60min. After cooling with tap water, the absorbance was measured at 532nm.

a) : MDA μ M. Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments.

2. 자유기 소거 효과

시호사물탕의 자유기 소거능을 관찰하기 위하여 본 실험에서는 DPPH radical을 사용하여 농도별 시호사물탕과 반응시킨 다음, 흡광도를 측정하고 그 결과를 RSA(Radical Scavenging Activity) %로 표기하였다. 본 실험의 결과, 항산화제인 BHT, BHA 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서는 각각 90.38, 87.85, 79.24%의 강한 DPPH radical 소거능을 나타내었다. 한편 시호사물탕 추출물을 농도별로 4,000, 2,000, 1,000, 900, 800,

700, 600, 500, 400, 300, 200 μ g을 첨가한 실험군에서는 각각 64.01, 66.44, 68.49, 68.84, 73.63, 72.26, 73.28, 71.92, 69.86, 68.15, 63.36%로서 이상의 모든 실험군에서 60%를 초과하는 DPPH radical 소거능을 보였으며 특히 최고 73%를 넘는 강한 소거능을 나타

Table III. Scavenging Effect of Sihosamultang on DPPH Radical

Groups	Concentration (μ g)	RSA(%)* of control (%)
1% BHT	-	90.38
1% BHA	-	87.85
1% Tocopherol	-	79.24
SST	4,000	64.01
	2,000	66.44
	1,000	68.49
	900	68.84
	800	73.63
	700	72.26
	600	73.28
	500	71.92
	400	69.86
	300	68.15
	200	63.36
	100	50.00
	50	32.88

내었다. 한편 시호사물탕 추출물을 100, 50 μ g 으로 소량 첨가한 실험군에서도 50.00, 32.88%의 자유기 소거능을 보였다. 이상의 실험에서 시호사물탕 추출물은 강력한 자유기 소거능이 있음을 알 수 있었다(Tabe III).

3. Hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응 억제 효과

생체내에서 자유기에 의한 지질과산화 반응의 개시 단계에서 주요한 역할을 담당하고 있는 hydroxyl radical(\cdot OH)에 대한 시호사물탕의 효과를 규명하기 위하여 본 실험에서는

$H_2O_2-Fe^{2+}$ 로 구성되는 Fenton 반응계를 사용하여 hydroxyl radical을 생성시키고, 흰쥐의 간조직 균질액을 첨가하여 hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응을 유도하였다. 본 실험의 결과, 대조군에서의 지질과산화물의 함량은 38.76 μ M이었으나, 항산화제인 BHT를 첨가한 실험군에서는 2.70 μ M로 대조군에 비해 약 93%의 억제 효과를 보였다. 한편 시호사물탕 추출물을 농도별로 1,000, 800, 400, 200, 100 μ g을 첨가한 실험군에서는 각각 4.79, 4.36, 5.67, 8.90, 18.25 μ M로 대조군에 비해 87.65, 88.74, 85.36, 77.04, 52.91%의 지질과산화물 생성 억제 효과를 보였다. 본 실험의 결

Table IV. Effect of Sihosamultang on the Lipid Peroxidation of Rat Homogenate induced by Fenton Reaction System

Groups	Concentration	MDA	Inhibition
	(μ g)	(μ M)	(%)
Control	-	38.76 \pm 0.55	-
1% BHT	-	2.70 \pm 0.11 *** ^{a)}	93.04
SST	1,000	4.79 \pm 0.18 ***	87.65
	800	4.36 \pm 0.39 ***	88.74
	400	5.67 \pm 0.06 ***	85.36
	200	8.90 \pm 0.15 ***	77.04
	100	18.25 \pm 0.15 ***	52.91
	80	29.66 \pm 3.66	23.48
	40	35.55 \pm 3.46	8.28

SST in 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) were added to homogenate (7.5mg/ml), 1mM $FeCl_2$, 3mM H_2O_2 . The mixture was shaken at 37°C for 10min. The level of lipid peroxidation induced by hydroxyl radical derived from $H_2O_2-Fe^{2+}$ in rat liver homogenate was determined according to the method of TBA. Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments.

a) : values statically significant as compared with control data of each group.
(*** : p<0.01)

과, 시호사물탕 추출물은 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 최고 88%까지 억제할 수 있는 강력한 항산화 효능이 있음을 알 수 있었다. (Table IV).

4. Xanthine-XOD 반응계에서의 superoxide 생성 억제 효과

본 실험에서는 hydroxyl radical과 더불어 생체내에서 산화적 손상을 야기하는 주된 자유기로 알려져 있는 superoxide($O_2^{\cdot-}$)에 대한 시호사물탕의 효과를 규명하기 위하여

가한 실험군에서 아무런 처치도 하지 않은 대조군에 비해 각각 74.77, 69.55, 52.95%의 현저한 superoxide 생성 억제 효과를 나타내었고, 특히 최고 74%를 넘는 강한 효능을 보였다. 한편 200, 100, 80, 40, 20, 10 μ g의 시호사물탕 추출물을 첨가한 실험군에서는 각각 43.64, 32.95, 29.09, 20.00, 15.68, 13.41%의 농도 의존적인 superoxide 생성 억제 효과를 보였다(Table V).

Table V. Inhibitory Effect of Sihosamultang on Superoxide Generation Induced by Xanthine-Xanthine Oxidase System

Groups	Concentration	Inhibition of control
	(μ g)	(%)
SST	1,000	74.77 \pm 3.12
	800	69.55 \pm 1.54
	400	52.95 \pm 3.16
	200	43.64 \pm 2.88
	100	32.95 \pm 3.11
	80	29.09 \pm 1.75
	40	20.00 \pm 0.36
	20	15.68 \pm 1.69
	10	13.41 \pm 1.95

The reaction mixture contained SST, 250 μ M xanthine, 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) was left to stand at room temperature for 3min. After 0.1unit of xanthine oxidase was added, the absorbance of reaction mixture was measured spectrophotometrically at 290nm for 1min. All data are the mean \pm standard error of triplicate experiments.

xanthine -XOD 반응계를 사용하여 superoxide를 생성시켰다. 그 결과, 시호사물탕 추출물을 농도별로 1,000, 800, 400 μ g을 첨

5. 흰쥐 정상 간세포에 대한 독성

본 실험에서는 배양 정상 간세포를 이용하여 시호사물탕의 항산화 효능을 규명하기 위한 실험의 일환으로 먼저 본 약물의 세포 독성 여부를 규명하고자 하였다. 시호사물탕 추출물의 간세포 독성 여부를 관찰하기 위하여 96-well plate에 흰쥐의 정상 간세포를 배양하고, 농도별 시호사물탕 추출물을 전처리한 다음, 일정 시간 경과후 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 그 결과 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을때 시호사물탕을 well당 2,000, 1,000, 500 μ g을 첨가한 실험군에서는 각각 25.17,

49.24, 58.75%의 세포 생존율을 보였다. 따라서 500 μ g 이상의 시호사물탕 첨가군에서는 현저한 간세포 독성을 나타냄을 알 수 있었다. 반면, 시호사물탕 추출물을 well당 250 μ g 첨가하였을 때 83.66%로 세포생존율이 현저하게 증가하였으며, well당 100, 50, 25, 10, 5 μ g을 첨가한 실험군에서는 각각 98.27, 97.21, 99.53, 98.58, 98.16%의 높은 세포 생존율을 보였다. 본 실험의 결과, 특히 well당 100 μ g 이하의 시호사물탕 추출물을 첨가한 모든 실험군에서는 거의 100%에 가까운 세포 생존율을 보였으므로 시호사물탕 추출물의 첨가량을 well당 100 μ g 이하로 제한할 경우, 정상 간세포에 대한 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다 (Table VI).

Table VI. Cytotoxicity of Sihosamultang on Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Concentration (μ g/well)	Viability(%) of control (%)
SST	2,000	25.17 \pm 1.56 ***
	1,000	49.24 \pm 2.79 ***
	500	58.75 \pm 4.37 ***
	250	83.66 \pm 7.92
	100	98.27 \pm 4.50
	50	97.21 \pm 3.25
	25	99.53 \pm 4.35
	10	98.58 \pm 4.14
	5	98.16 \pm 5.95

Normal rat liver cells(Ac2F) were plated on 75-cm² plastic flasks in 20ml of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO₂, 95% air, at 37°C. The cells(5 \times 10⁴cells/well) were incubated at 37°C for 2hrs. After washing, SST were added various concentration. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean \pm standard error of triplicated determination. Values statically significant as compared with control data of each group. (** : p<0.02, *** : p<0.01)

6. 흰쥐 정상 간세포의 산화적 손상 억제 효능

본 실험에서는 흰쥐의 정상 간세포에 대한 시호사물탕의 항산화 효능을 관찰하기 위하여 먼저 흰쥐 정상 간세포를 96-well plate에 흰쥐의 배양한 다음, 농도별 시호사물탕 추출물을 전처리하였다. 일정시간 배양시킨 다음, 간세포의 산화적 손상을 유도하기 위해 *t*-BHP를 첨가하고 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, *t*-BHP만을 처리한 실험군에서는 50.26%의 세포 생존율을 나타내었다. 이 결과에서 *t*-BHP를 처리함으로써 약 50%의 간세포가

산화적 손상으로 괴사되었음을 알 수 있었다. 한편 시호사물탕 추출물을 농도별로 well당 2,000, 1,000, 500, 250 μ g을 전처리한 다음, *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 각각 17.45, 22.96, 23.70, 50.03%로 *t*-BHP 단독 처리군의 50.26%보다 오히려 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 이 결과에서 세포 생존율이 *t*-BHP 단독 처리군보다 감소한 것은 *t*-BHP에 의한 산화적 손상과 시호사물탕 추출물의 세포독성이 함께 작용한 결과임을 알 수 있었다. 반면 시호사물탕 추출물을 세포독성을 나타내지 않는 농도, 즉 well당 100, 50, 25, 10 μ g을 전처리한 다음 *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 각각 56.75, 63.48, 55.07, 56.28%로 *t*-BHP 단독 처리군에 비하여 높은

Table VII. Effect of Sihosamultang on *t*-BHP Induced Lipid Peroxidation in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Concentration	Viability(%) of control
	(μ g/well)	(%)
<i>t</i> -BHP ^{a)}		50.26 \pm 2.68
SST ^{b)}	2,000	17.45 \pm 1.11
	1,000	22.96 \pm 3.30
	500	23.70 \pm 2.80
	250	50.03 \pm 3.38
	100	56.75 \pm 2.37
	50	63.48 \pm 1.85 ***
	25	55.07 \pm 1.31
	10	56.28 \pm 1.48

Normal rat liver cells(Ac2F) were plated on 75-cm² plastic flasks in 20ml of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO₂, 95% air, at 37°C. The cells(5 \times 10⁴cells/well) were incubated at 37°C for 2hrs. After washing, SST were added various concentration. After preincubation for 18hrs, *t*-BHP(final concentration 1mM) was added, and the reaction mixture was incubated for 2hrs. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean \pm standard error of triplicated determination.

a) *t*-BHP : *t*-BHP treated group.

b) SST : Sihosamultang pretreated and *t*-BHP treated group.

세포 생존율을 보였다. 특히 이 결과에서 시호사물탕 추출물을 well당 50 μ g을 첨가할 경우 63%의 가장 높은 세포 생존율을 보였으므로 *t*-BHP에 의한 세포 피사를 강하게 억제함을 알 수 있었다. (Table VII).

IV. 고 찰

지질과산화 반응은 세포의 산화적 손상에 있어서 가장 일반적인 기전 중의 하나이며, 특히 자유기에 의한 세포막 인지질의 연쇄적 과산화 반응에 의하여 세포막 파괴 및 세포 피사가 야기된다²⁰⁾. 본 연구에서는 시호사물탕의 항산화 효능에 의한 세포 보호 효과를 규명하기 위한 일환으로 먼저 linoleic acid를 이용한 지질 자동산화계에서 본 약물의 과산화지질 생성 억제 효과를 검토하였다. 일반적으로 지질의 과산화 반응은 분자상의 산소가 불포화지방산에 부가되는 반응으로서 반응개시 단계에서 불포화지방산의 탄화수소(LH)로부터 수소(H)가 탈취되어 fatty acid radical(L·)되며, 다시 산소 분자와 결합하여 peroxy radical(L· + O₂ → LOO·)을 생성하고, peroxy radical은 다시 탄화수소와 반응하여 과산화지질과 지질 라디칼(LOO· + LH → L· + LOOH)을 생성한다. 이 반응단계에서 과산화지질(LOOH)과 함께 생성된 지질 라디칼(L·)은 다시 산소분자와 결합함으로써 지질과산화 반응은 연쇄적으로 진행되며, 이러한 연쇄반응을 통하여 과산화지질의 생성은 진행된다. 본 연구에서 시호사물탕 추출물은 이와같은 지질과산화 반응에 의한 과산화지질의 생성을 현저하게 억제하였으며, 특히 항산화제인 BHT, BHA와 유사한 수준의 항산화 효과를 보였다. BHT 및 BHA는 페놀화합물(phenolic compound)로서 자유기에 수소를 쉽게 공여함으로써 지질과산화 반응을 억제하는 뛰어난 항산화력을 지닌 인공 합성 항산화제이지만 변이원성, 세포독성과 같은

심각한 부작용이 우려되어 사용이 제한되고 있다²¹⁾. 본 실험의 결과로부터 시호사물탕 추출물은 연쇄적인 지질과산화 반응 단계에서 자유기를 소거함으로써 과산화지질의 생성을 억제한 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 DPPH radical을 이용하여 시호사물탕 추출물의 자유기 소거능을 검토하였다. 그 결과 시호사물탕 추출물은 약 73%에 달하는 자유기 소거 효과를 보였으므로, 본 약물은 자유기에 수소 혹은 전자를 공여함으로써 자유기의 활성을 저해할 수 있는 항산화제로서의 효능을 지니고 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 시호사물탕의 자유기 소거능에 대한 구체적인 효능을 알아보기 위하여 생체내에서 산화적 손상을 야기하는 주된 자유기 중의 하나로 알려져 있는 hydroxyl radical에 대한 영향을 관찰하였다. Hydroxyl radical은 생체내에서 산화적 손상을 야기하는 주된 자유기로서 일반적으로 superoxide anion, singlet oxygen 및 peroxy radical 보다도 강한 활성을 지니고 있다고 알려져 있으며, 특히 방사선에 의한 손상에 있어서 주된 역할을 담당하고 있다²²⁾. 본 실험의 결과 Fenton 반응계(H₂O₂ + Fe²⁺)에서 생성된 hydroxyl radical은 흰쥐의 간조직 균질액의 지질과산화 반응을 현저하게 증가시켰으나 시호사물탕 추출물의 첨가로 인해 hydroxyl radical에 의한 지질과산화물의 생성이 최고 88%까지 현저하게 억제되었다. 또한 본 연구에서는 hydroxyl radical과 더불어 생체내에서 산화적 손상을 야기하는 주된 자유기로 알려져 있는 superoxide anion에 대한 시호사물탕의 생성 억제 효능을 xanthine-XOD 반응계에서 검토하였다. 생체내에서 superoxide는 다양한 효소반응, 각종 유기물의 자동산화, 탐식세포의 식작용(phagocytosis) 등의 과정에서 생성되며, 주로 superoxide dismutase (SOD)의 작용을 받아 비교적으로 활성이 낮은 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환되어지며, hydrogen peroxide는 catalase에

의해 H₂O로 전환되어 안전하게 배설되지만, 이 과정에서 더욱 활성이 강한 hydroxyl radical로 변환되기도 한다²³⁻²⁴). 본 연구의 결과, 시호사물탕 추출물은 xanthine- XOD 반응계에서 superoxide anion의 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 최고 74%에 이르는 강한 억제 효과를 보였다. 이상의 연구결과에서 시호사물탕 추출물은 자유기 소거 및 생성 억제 효과를 보였으며, 자유기에 의한 과산화지질의 생성 또한 현저하게 억제하였다. 그러나 기존의 인공 합성 항산화제인 BHA와 BHT가 그들의 강한 항산화력에도 불구하고 세포 독성이 문제시 되고 있으므로 본 실험에서는 시호사물탕 추출물의 안전성을 평가하기 위하여 간세포 독성 여부를 검토하였다. 흰쥐 배양 정상 간세포를 96-well plate에 배양하여 농도별 시호사물탕 추출물을 전처리한 다음, 일정 시간 경과후 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 그 결과 시호사물탕 추출물을 well당 500 μ g 이상을 첨가한 실험군에서는 현저한 간세포 독성이 나타났으나, 100 μ g 이하로 첨가한 실험군에서는 100%에 가까운 세포 생존율을 보였다. 이러한 연구결과에서 시호사물탕 추출물이 정상 간세포에 독성을 나타내지 않는 약물 농도를 규명하였으므로, 그 안전한 농도 범위에서 본 약물이 간세포의 산화적 손상을 보호할 수 있는가를 관찰하고자 하였다. 즉, 시호사물탕 추출물의 항산화효능을 세포수준에서 규명하기 위하여 배양 간세포에 *t*-BHP의 처리로 야기되는 산화적 손상 및 세포피사에 본 약물이 어떤 영향을 미치는가를 실험적으로 관찰하였다. 일반적으로 *t*-BHP는 급성 산화적 스트레스로 인한 비가역적인 세포 손상의 기전 연구에 주요 모델로서 빈번하게 사용되고 있다. 또한 간세포에 대한 *t*-BHP의 독성 발현은 본 약물에 의해 간세포의 막을 구성하는 인지질의 과산화 반응에 기인하는 것으로 보고되었으며, 배양 간세포에서의 이러한 산화적 손상은 특히 1mM 이하로 처리

할 경우 유발되는 것으로 알려져 있다²⁵). 본 실험에서 배양 간세포에 농도별 시호 약침액을 전처리한 후, *t*-BHP를 최종농도가 1mM 이 되도록 처리한 다음 세포의 생존율을 MTT assay로 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 *t*-BHP 단독 처리군에서의 세포생존율은 약 50%로 감소하였으므로 간세포의 산화적 손상이 강하게 야기되었음을 알 수 있었다. 반면 시호사물탕 추출물을 well당 50 μ g을 전처리함으로써 세포생존율은 63%로 증가하였다. 따라서 시호사물탕 추출물이 정상 간세포에 독성을 나타내지 않는 농도에서 *t*-BHP에 의한 세포 피사를 강하게 억제함을 알 수 있었다.

V. 결 론

본 연구에서 시호사물탕이 자유기에 의한 지질과산화 반응에 미치는 효과를 규명하기 위하여 지질의 자동산화 억제효과, DPPH radical 소거능, hydroxyl radical에 의한 간조직의 지질과산화 억제효과 및 superoxide 생성 억제 효과를 관찰하였다. 또한 *t*-BHP에 의한 흰쥐 정상 간세포의 산화적 손상에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Linoleic acid를 이용한 지질 자동산화계에서 시호사물탕 추출물은 과산화지질의 생성을 현저하게 억제하였다.
2. DPPH radical에 대하여 시호사물탕 추출물은 최고 73%의 강한 자유기 소거 효과를 나타내었다.
3. Fenton 반응계에서 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 시호사물탕은 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 본 실험에서는 자유기에 의한 과산화

- 지질의 생성을 최고 88% 억제하였다.
4. Xanthine-XOD계로부터 생성되는 superoxide에 대하여 시호사물탕 추출물은 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 본 실험에서는 최고 74%의 강한 생성 억제 효과를 나타내었다.
 5. 흰쥐 정상 간세포에 대한 세포독성 실험에서 시호사물탕 추출물의 첨가를 well 당 250 μ g 이하로 제한할 경우 세포독성은 나타나지 않았다.
 6. 정상 간세포에 독성을 나타내지 않은 농도로 시호사물탕 추출물을 전처리함으로써 *t*-BHP로 유도되는 세포의 산화적 손상 및 세포괴사를 억제하였다.
 7. 문진영, 최미정, 남경수, 임종국 : 시호가 free radical에 의한 지질과산화물 생성에 미치는 효과. 동국논집(자연과학편) 1996; 15 : 361-375
 8. 문진영, 임종국 : 시호 약침제제의 자유기 소거능 및 지질과산화 억제효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1998 ; 15(2) :135-145.
 9. 김성일, 문진영, 김갑성, 김두희, 남경수, 임종국 : 자유기에 의한 지질과산화 반응에 대한 황금 약침액의 항산화 효능. 1997; 대한예방한의학회지 1 : 48-54
 10. 임창수, 김갑성 : 작약 약침액의 항산화효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1997; 14(2) : 191-198
 11. 임창수, 김갑성 : 작약 약침의 항산화효능에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999; 16(3) : 269-286
 12. 문진영 : 작약 약침액이 *tert*-butyl hydroperoxide로 유도된 흰쥐 배양 간세포의 지질과 산화반응 및 항산화효소 활성화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2000 ; 17(3) : 176-187

<참 고 문 헌>

1. Ames, B. N., Cahcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. : Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. A hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1981 ; 78 : 6858-6862
2. Aruoma, O. I., Kaur, H. and Halliwell, B.: Oxygen free radicals and human disease. J. Roy. Soc. Health 1991 ; 111(5) : 172-177
3. 劉守眞. 河間醫集. 북경 : 인민위생출판사. 1998 : 498
4. 허준. 동의보감(부인문). 서울 : 대성문화사. 1992 : 32
5. 전국한의과대학 간계내과학 교수. 간계내과학. 서울 : 동양의학연구원. 1989 : 47-59.
6. 하지용, 백태현, 이재복 : 시호사물탕이 CCl₄로 유발된 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한동의병리학회지 1997 ; 11(2) : 27-36
13. 孫承琳 : 人蔘對培養神經細胞自由基損傷的保護作用. 北京中醫學院報 1993 ; 6 : 62-67
14. 안준철, 문진영, 임종국 : 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구(II). 대한침구학회지 1997 ; 14 : 383-395
15. 안준철, 문진영, 임종국 : 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구. 대한침구학회지 1996; 13 : 254-262
16. Osawa, T., Namiki, M. : A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. Agric. Biol. Chem. 1981 ; 45 : 735-739
17. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochem. 1978 ; 95 : 351-358
18. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T.,

- Okuda, T. : Two new flavonoids and other constituents in licorice root : their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bull. 1988 ; 36 : 2090-2097
19. Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H. and Balls, M. : An improved MTT assay. J. Immun. Methods 1993 ; 157 : 203-207
20. Masaki N, Kyle ME and Farber JL. *tert*-Butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. Arch. Biochem. Biophys. 1989 ; 269 : 390-399
21. Branen, A. L.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS 1975 ; 52 : 59-63
22. 大柳善彦. SODと活性酸素調節剤その薬理作用と臨床應用. 東京 : 日本醫學館. 1989 : 9
23. Musarrat, J. and Wani, A. A. : Quantitative immunoanalysis of promutagenic 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in oxidized DNA. Carcinogenesis 1994 ; 15 : 2037-2043
24. Oberley, L. W. and Buettner, G. R. : Role superoxide dismutase in cancer. Cancer Res. 1979 ; 39 : 1141-1149
25. Masaki, N., Kyle, M. E., Serroni, A., Farber, J. L. : Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by *tert*-butyl hydroperoxide. Arch. Biochem. Biophys. 1989 ; 270 : 672