

穀芽枳實小柴胡湯의 肝保護作用에 關한 實驗的 研究

전영세, 김영진, 강대근, 이재익, 김강산, 강병기

원광대학교 한의과대학 내과학교실

An Experimental Study on the Hepatoprotective Effect of *Gokajisilsoho-Tang*

Cheon Young Sae, Kim Young Jin, Kang Dae Geun, Lee Jae Ik, Kim Kang San, Kang Byung Ki

Department of Oriental Medicine Graduate School of Wonkwang University

This study was performed to elucidate the effects of Gokajisilsoho-Tang(GJST) on the lactic dehydrogenase(LDH) release, cell viability and activity, lipid peroxidation, DNA synthesis and the changes of total protein synthesis and GSH changes in vivo and in vitro in rat cultured hepatocytes from hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced injury.

The GJST extract had not an effect on cytotoxicity in all experimental results. The treatment of GJST extract of 160 μ g/ml, 320 μ g/ml showed the significant effect to decrease LDH leakage induced by t-BHP in cultured rat hepatocytes. The higher concentration of GJST extract than 160 μ g/ml, showed the inhibitory effect on decreasing cell viability induced by t-BHP. The treatment of t-BHP to rat cultured hepatocytes resulted in a concentration dependent increase in TBARS, in the presence of GJST extract the production of TBARS induced by hydrogen peroxide was inhibited concentration dependently, significantly inhibited at 80 μ g/ml of GJST extract and above. The GJST extract simultaneously present with t-BHP prevented the loss of total protein and GSH in a concentration dependent manner.

These results suggested that GJST extract may play a hepatoprotective role in oxidative damage induced by hydrogen peroxide and a therapeutic potential of inhibiting liver injury.

Key Word : *Gokajisilsoho-Tang*(GJST), hepatocytes, hydrogen peroxide(H₂O₂)

1. 緒 論

穀芽枳實小柴胡湯은 小柴胡湯에 穀芽, 枳實, 厚朴, 山梔子, 大黃과 陳皮를 加味한 處方으로서, 明代 徐¹⁾의 《古今醫統秘方大全》에 처음 수록되었으며 肝膽濕熱로 인한 黃疸 등 肝膽道疾患에 사용한다고 기재되어 있다.

小柴胡湯은 각종 肝疾患, 外感性疾患 등에 응용되는 處方으로서, 牧坂²⁾, 熊谷³⁾, 市田⁴⁾에 의해 임상적으로 慢性 B型肝炎의 간기능 회복 및 HBeAg의 seroconversion, seronegative 등 바이러스학적인 有意性이 있음을 보고하였

다. 이러한 점에서 小柴胡湯과 그 加味方인 穀芽枳實小柴胡湯은 肝疾患에 유효할 것으로 생각되지만, 아직 구체적인 연구는 미흡한 실정이다.

本 研究에서는 穀芽枳實小柴胡湯의 抗酸化機轉으로 인한 肝保護作用을 觀察하기 위하여 白鼠의 培養肝細胞에 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)를 이용하여 평가하였다. 활성산소의 일종인 hydroperoxide는 脂質過酸化를 促進하며 細胞內 glutathione(GSH)등의 含量을 줄이는 역할을 한다. 또한 lipopolysaccharide(LPS) 內毒素 등으로 誘發한 酸化的 損傷은 사람이나 동물에서

GSH등 여러 가지 抗酸化劑의 抑制機轉으로 작용하며^{4,5)}, 內毒素로 誘發한 肝損傷은 血漿내의 transaminases 含量을 增加시키고 super oxide dismutase, catalase, α -tocopherol, allopurinol등의 抗酸化劑는 이러한 肝損傷을 抑制하는 것으로 報告되었다⁶⁾. 그러므로 여러 가지 반응성 산소종의 intermediates는 다른 target molecules들과 반응하여 肝 등 여러 組織을 損傷하고 老化, 癌 등의 原因 因子로 생각되기 때문에 hydroperoxide에 의하여 誘發되는 酸化的 組織 損傷을 抗酸化劑 등으로 抑制하는 것은 肝疾患을 비롯한 老化, 癌 등의 重要한 治療 手段이 될 수 있을 것으로 思料되어⁷⁾ hydro

peroxide와 LPS등으로 誘發한 酸化的 損傷 모델을 이용하여 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 肝細胞 保護作用을 in vitro와 in vivo에서 觀察하였다.

II. 對象 및 方法

1. 材料

1) 動物

實驗動物로는 雄性 白鼠 (male Sprague Dawley rats; 230-280g와 male Wistar rats; 200-250g)를 使用하였으며, 實驗動物은 12시간 간격의 明暗 調節下에 물과 飼料(삼양사)를 마음대로 하도록 하여 環境에 適應하도록 한 뒤에 使用하였고 도살 전에는 12시간 금식시켰다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 穀芽枳實小柴胡湯의 處方內容은 《古今醫統秘方大全》¹⁾에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 益山韓方病院에서 精選하여 使用하였고, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of Gokajisilosihō-Tang(JST)

本草名	生藥名	重量(g)
穀芽	Fructus oryzae germinatus	3.75
枳實	Fructus immaturus ponciri	3.75
厚朴	Cortex magnoliae	3.75
山梔	Fructus gardeniae	2.25
大黃	Rhizoma rhei	2.25
柴胡	Radix bupleuri	2.25
黃芩	Radix scutellariae	2.25
陳皮	Pericarpium citri nobilis	1.875
半夏	Tuber pinelliae	1.875
人蔘	Radix jinseng	1.875
炙甘草	Radix glycyrrhizae(boild)	1.875
總計		27.25

2. 方法

1) In vitro assay

① 白鼠 肝細胞 分離 및 培養

白鼠 肝細胞의 分離 및 培養은 2단계의 collagenase 관류법으로 시행하였다²⁾.

② 培養細胞의 過酸化水素 處理

培養肝細胞를 serum free medium에 간세포를 4시간 培養한 후 0.0mM에서 1.0mM의 t-BHP를 40분간 處理하였다. Malondialdehyde의 生成 反應을 위하여 90mm Petri dishes에 6ml의 培養液으로 實施하였고 GSH의 細胞內 含量을 줄이기 위하여 1mM의 diethylmalate(DEM)로 2시간 前 處置하였다. DEM은 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해하여 使用하였고 培養液속에서 DMSO의 含量은 1%를 넘지 않도록 조절하였다. 培養液 속에 포함된 DEM은 hydroperoxide에 露出시키기 전에 吸入하여 處理하였다.

③ 培養細胞에 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 處置

穀芽枳實小柴胡湯 抽出物은 t-BHP를 40分 處置하는 동시에 處理한 것과 t-BHP를 處理하기 전에 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 40分 동안 前處置한 것으로 나누었다. 處置後에는 培養液은 정상

배지로 교환하여 주고 過酸化水素를 포함한 배지에 20分 동안 더 處理하였다.

④ 細胞毒性的 측정

穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 肝細胞에 대한 細胞毒性的의 保護效果를 lactate dehydrogenase(LDH)의 漏出과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 법³⁾으로 측정하였다.

MTT assay는 Mosmann 등³⁾의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 培養肝細胞를 4시간 동안 hydroperoxide에 露出한 후 24 wells에 있는 각각의 細胞層을 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 완충액으로 세척하였다. 살아있는 細胞의 mitochondria dehydrogenase에 의해 MTT가 spectrophotometer로 측정 가능한 blue formazan product로 cellular reduction되는 것에 근거하여 MTT assay를 실시하였다. 각 實驗條件에서 細胞를 培養한 後 생리식염수에 용해한 MTT 용액(最終濃度 1mg/ml, Sigma Co., MO., U.S.A.)을 각 well에 100μ씩 넣고 37℃에서 4시간 동안 反應시킨 後 10% sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액 100μ를 첨가하여 formazan crystal이 용해되도록 한 후 각각의 實驗조건에서 細胞를 37℃에서 12시간 동안 培養하고, 형성된 formazan crystal을 측정하기 위하여 plate를 잘 흔든 후 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader (Molecular Devices, U.S.A.)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

⑤ 脂質過酸化의 측정

培養肝細胞를 2시간 동안 hydroperoxide에 露出한 후 24 wells에 있는 각각의 細胞層의 上清液을 수집하여 -20℃에 보관하였다. 細胞의 수집은 scraper를 使用하였다. 脂質酸化의 정도는 細胞培養 洗滌液인 HBSS 완충액

속의 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 측정하여 그 변화를 관찰하였으며, 세포내의 TBARS의 변화는 Yagi 등¹⁰⁾의 방법에 의하여 측정하였다.

⑥ ³[H]-thymidine incorporation을 이용한 DNA 합성량 측정

배양간세포를 10% fetal bovine serum(FBS)를 포함한 배양액에 재현탁하여 1×10⁶ cells/ml의 농도로 조절하고 24 wells plate에 배양하였다. 20시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 다음 정상배지로 2회 세척한 후 2% FBS를 포함한 배지로 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 희석하여 세포에 가하였다. ³[H]-thymidine incorporation을 측정하기 위하여 모든 plate를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 90분 동안 더 배양한 다음, 1μCi ³[H]-thymidine을 각 well에 첨가하고 plate를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양하였다. 각 well을 HBSS 緩衝液으로 3회 세척하고 10% trichloroacetic acid(TCA) 0.5ml로 4℃에서 30분 동안 고정하였다. HBSS 완충액으로 3회 세척하여 10% TCA를 제거하고 0.2N NaOH에 녹인 0.1% SDS 용액 0.5ml를 각 well에 가하고 DNA를 용해하기 위하여 60℃에서 2시간 동안 배양하였다.

용해액은 liquid scintillation cocktail

10ml와 혼합하여 radioactivity를 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였으며, 모든 검사는 최소한 3회씩 실시하였다.

⑦ 總蛋白質 합성량 및 GSH含量 측정

Sulforhodamine B(SRB) 검색법은 세포가 합성한 總蛋白質을 측정하는 방법으로 SRB는 세포를 밝은 분홍색으로 염색시킨다. 각 실험조건에서 배양한 세포에 50% cold TCA를 50μl/well씩 가하여 최종 농도를 10%로 만들고 4℃에서 1시간 동안 방치한 후 단백질 침전에 의한 세포 고정을 유도하였다. 증류수로 5회 세척하고 나서 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB 용액 50μl/well을 가하여 상온에서 30분간 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 결합하지 않은 염색물을 제거하였다. 세포를 잘 건조시킨 후 10mM/L unbuffered tris(hydroxy) aminome thane (Tris base) 150μl로 SRB-bound protein을 잘 용해시키고 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포내와 배지내의 총 GSH의 측정은 Buege 등¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였으며, oxidized glutathione(GSSG)의含量測定은 Tietze 등^{12,13)}의 방법을 약간 변형한 Jaeschke 등¹⁴⁾의 방법에 따

라 측정하였다.

2) 統計處理

實驗結果의 統計處理는 student's t-test를 이용하였고, P 값이 0.05이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였으며 실험치의 표현은 Mean±SE로 하였다.

III. 結果

1. 培養肝細胞의 LDH 漏出에 미치는 影響

배양간세포를 hydroperoxide와 함께 배양을 하면 hydroperoxide의 농도의 존재로 LDH가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 배양 4시간에 t-BHP를 200μM 이상 處理한 實驗群에서 LDH 漏出이 유의성(p<0.01)있는 증가를 나타냈다. 이러한 細胞損傷으로 인한 LDH의 배양液內로의 漏出은 t-BHP와 동시 배양하여 4시간과 6시간에서 특히 200μM과 500μM의 농도에서 매우 유의성(p<0.01)있게 증가하는 것으로 나타났다. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 20μg/ml에서 320μg/ml의 농도까지 배양간세포와 함께 16시간 동안 preincubation 하면 t-BHP를 200μM과 500μM을 투여한 實驗群에서 LDH의 漏出이 점차 減少하는 경향을 볼 수 있었고 특히 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物 80μg/ml 이상의

Table 1. Effect of Gokajisilsosihotang(GJST) extract on the t-BHP induced release of LDH from cultured rat hepatocytes

t-BHP Concentration (μM)	Increase of LDH Release(% of control)					
	GJST 0 μg/ml	GJST 20 μg/ml	GJST 40 μg/ml	GJST 80 μg/ml	GJST 160 μg/ml	GJST 320 μg/ml
0	0	1.5±0.3	1.7±0.2	1.6±0.4	2.1±0.4	2.0±0.3
200	35.1±2.7	29.9±2.1	26.2±2.3	20.1±1.8*	17.7±1.4**	14.2±1.2**
500	57.9±4.5	55.7±4.8	47.5±4.2	36.3±3.1*	30.6±2.5**	25.5±1.9**

The value represents the mean±SE of 6 samples. P value denotes the difference from control. * : p<0.05, ** : p<0.01.

濃度에서 유의성(p<0.05, p<0.01)있는 LDH 漏出의 減少 效果를 나타냈으며, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物 160, 320 μ g/ml의 濃度에서 가장 有意性있는 LDH 漏出減少 效果를 보였다(Table 1).

2. 培養肝細胞의 細胞活性度에 미치는 影響

培養肝細胞의 培養細胞數가 增加함에 따라 570nm에서 MTT의 흡광도가 점차 增加하는 것을 觀察할 수 있었으며, 24시간의 培養시간에서는 직선의 相關關係를 나타냈다. t-BHP를 處理하면 농도 의존적으로 細胞의 활성도가 減少하였고 t-BHP 500 μ M의 濃度에서부터 有意性있는 MTT 흡광도 減少效果를 보였다. 시간 경과에 따른 細胞 活性의 손상효과를 보면 특히, t-BHP 200 μ M과 500 μ M의 濃度에서 4시간과 6시간에 細胞의 손상 정도가 유의성(p<0.05, p<0.01)있는 減少效果를 보였다.

穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 10 μ g/ml의 濃度에서 320 μ g/ml의 濃度까지 투여하면 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物 濃度가 80 μ g/ml 以上일 때 t-BHP 200, 500 μ M을 투여한 실험군에서 유의성(p<0.05, p<0.01)있는 細胞活性 減少의 抑制效果를 나타냈다(Table 2).

3. 培養肝細胞의 脂質過酸化에 미치는 影響

t-BHP 100 μ M에서 1.0mM 사이의 농도를 培養肝細胞에 처리하면 培養液에서 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 축적이 발생하게 되어 細胞의 脂質過酸化를 觀察할 수 있었다. t-BHP를 투여하고 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 preincubation한 실험군에서 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 濃度增加에 따라 t-BHP의 투여로 誘發

Table 2. Effect of *Gokajisilsoho-Tang(GJST)* extract on t-BHP induced damage of cultured rat hepatocytes

Concentration GJST Extract(μ g/ml)	MTT Absorbance(570nm)		
	t-BHP 0 μ M	t-BHP 200 μ M	t-BHP 500 μ M
0	1.37 \pm 0.13	0.56 \pm 0.06	0.28 \pm 0.03
10	1.34 \pm 0.11	0.54 \pm 0.06	0.29 \pm 0.04
20	1.37 \pm 0.13	0.53 \pm 0.07	0.27 \pm 0.03
40	1.41 \pm 0.11	0.66 \pm 0.08	0.34 \pm 0.06
80	1.43 \pm 0.12	0.88 \pm 0.11**	0.52 \pm 0.07*
160	1.40 \pm 0.15	1.05 \pm 0.14**	0.89 \pm 0.09**
320	1.45 \pm 0.14	1.18 \pm 0.15**	1.04 \pm 0.14**

The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control. * : p<0.05, ** : p<0.01.

Table 3. Effect of *Gokajisilsoho-Tang(GJST)* extract on t-BHP induced lipid peroxidation of cultured rat hepatocytes

Concentration GJST Extract(μ g/ml)	MTT Absorbance(570nm)		
	t-BHP 0 μ M	t-BHP 200 μ M	t-BHP 500 μ M
CONT	421.8 \pm 32.3	886.3 \pm 71.3	1136.7 \pm 87.4
10	413.7 \pm 31.8	857.8 \pm 65.1	1054.8 \pm 102.5
20	416.2 \pm 33.7	765.3 \pm 46.5	956.9 \pm 79.5
40	422.6 \pm 33.3	634.1 \pm 38.6	857.9 \pm 81.5
80	421.3 \pm 35.7	576.8 \pm 35.6**	723.6 \pm 57.3*
160	431.6 \pm 28.6	499.4 \pm 36.3**	657.3 \pm 46.7**

The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control. * : p<0.05, ** : p<0.01.

Table 4. Dose response of *Gokajisilsoho-Tang(GJST)* extract on the 3 [H]-thymidine

Concentration GJST Extract(μ g/ml)	3 [H] cpm(% of control)
0	100
10	103.2 \pm 6.3
20	99.5 \pm 9.3
40	115.7 \pm 11.4
80	125.5 \pm 8.1
160	135.6 \pm 8.5*
320	156.8 \pm 11.1**

The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control. * p<0.05, ** p<0.01.

된 TBARS의 축적이 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 투여에 농도 의존적으로 減少하였으며, 특히 80 μ g/ml 이상의 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物 투여시

TBARS의 減少가 유의성(p<0.05, p<0.01)있게 나타났다(Table 3).

4. 培養肝細胞의 核酸合成能에 미치는 影響

穀芽枳實小柴胡湯 抽出物の 농도를 증가시킴에 따라 핵산합성의 增加는 細胞의 增加와 유사하게 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物の 투여에 농도 의존적으로 增加하였으며 160 $\mu\text{g/ml}$ 이상을 투여하였을 때 유의성(p<0.05, p<0.01)있게 增加하였다(Table 4).

5. 培養肝細胞의 總蛋白質 合成能에 미치는 影響

다양한 농도의 t-BHP의 투여로 誘發한 培養肝細胞의 總蛋白質 合成量의 變化는 2시간 배양시 t-BHP의 濃度增加에 따라 유의성있게 減少하는 결과를 나타냈다. 특히 t-BHP 500 μM 과 1000 μM 濃度에서 總蛋白質 合成量이 매우 유의성(p<0.01)있게 減少하였다. t-BHP 處理 시간의 變化에 따른 總蛋白質 合成量의 變化는 t-BHP 處理 4 시간 후의 總蛋白質의 合成量의 變化가 200, 500 μM 투여군에서 각각 대조군의 59.4 \pm 4.8%와 52.1 \pm 4.5%로 매우 유의성(p<0.01)있게 減少하였다. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物の 濃度增加에 따라 t-BHP의 투여로 總蛋白質 合成量의 정도가 減少하는 현상이 抑制되는 양상을 나타냈다. t-BHP 만을 투여한 대조군에서는 培養肝細胞의 總蛋白質의 合成量이 減少하는 정도가 심한 것에 비하여 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 處理한 실험군에서는 總蛋白質 合成量의 감소 정도가 抑制되는 양상을 보였으며, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物 160 $\mu\text{g/ml}$ 이상 투여 시에는 總蛋白質 合成量의 減少가 유의성(p<0.05, p<0.01)있게 抑制되었다

Table 5. Effect of *Gokajisilsoho-Tang(GJST)* extract on the changes of total protein

Concentration of GJST Extract($\mu\text{g/ml}$)	Total Protein(% of control)		
	t-BHP 0 μM	t-BHP 200 μM	t-BHP 500 μM
0	100	59.3 \pm 4.7	52.8 \pm 4.6
20	100	61.6 \pm 5.6	55.3 \pm 6.1
40	100	65.3 \pm 5.9	61.5 \pm 5.9
80	100	72.5 \pm 6.4	69.4 \pm 6.8
160	100	79.5 \pm 6.1*	73.6 \pm 6.0*
320	100	86.8 \pm 6.3**	84.4 \pm 6.4**

The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control. * : p<0.05, ** : p<0.01.

Table 6. Influence of t-BHP and *Gokajisilsoho-Tang(GJST)* extracts on total glutathione content in cultured rat hepatocytes

Concentration of GJST Extract($\mu\text{g/ml}$)	Total Protein(% of control)	
	t-BHP 0 μM	t-BHP 500 μM
0	35.6 \pm 2.5	21.6 \pm 2.3
20	34.3 \pm 2.6	22.3 \pm 2.1
40	33.6 \pm 3.1	23.1 \pm 2.6
80	36.0 \pm 2.1	28.9 \pm 2.5
160	32.6 \pm 2.4	30.4 \pm 3.1*
320	33.8 \pm 2.5	35.7 \pm 2.8**

The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control. * : p<0.05, ** : p<0.01.

(Table 5).

6. 培養肝細胞의 glutathione 合成能에 미치는 影響

培養肝細胞에서 t-BHP의 處理는 細胞내 GSH 含量을 減少시키고 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物은 培養肝細胞내 GSH 含量에 影響을 미치지 않는 것을 확인하였다. 培養肝細胞를 t-BHP에 노출시켰을 때 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物은 농도 의존적으로 t-BHP에 의한 세포내 GSH 含量의 減少를 억제하는 效果를 보였다. 특히 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 160 $\mu\text{g/ml}$ 이상을 투여하였을 때 세포내 GSH의 含量이 거의 정상수준으로

유지되는 것을 觀察할 수 있었다 (Table 6). 실험은 1시간동안 배양후 시행하였으며 培養肝細胞는 t-BHP를 處理하지 않은 실험군에서는 계속적으로 細胞培養液 내로 총 GSH를 GSH/GSSG 비가 대략 6.5 정도로 유지되는 것을 觀察할 수 있었으며 t-BHP를 투여하였을 때는 GSH/GSSG의 비율이 0.4 정도로 變換되는 것을 보였다. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物만을 투여하였을 때는 환원되거나 산화된 총 GSH의 세포의 유출이 농도에 따른 變換을 보이지 않았으며, t-BHP만을 투여하였을 때는 이러한 GSH의 세포의 유출을 역전시키는 현상을 보였으나, 穀芽枳實小柴

胡湯 抽出物을 투여하였 때는 이러한 GSH의 세포의 유출을 抑制시키는 效果를 나타냈다. 특히 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物 160 μ g/ml 이상의 濃度에서는 세포의 GSH 유출을 有意性있게 억제시키는 效果를 보였다(Table 7).

IV. 考 察

穀芽枳實小柴胡湯은 穀疸, 食已即肌, 頭痛, 心中鬱拂不安, 飢飽所致蒸變而黃症 등에 응용되며¹⁾, 肝膽道疾患의 치료제로 사용되고 있는 小柴胡湯과 大黃, 梔子, 茵陳으로 구성되는 茵陳蒿湯에서 茵陳을 빼고 穀芽, 枳實, 厚朴, 陳皮를 加味한 處方으로서 역시 肝疾患 치료제로 사용되는 處方이다. 小柴胡湯에 대한 研究로서, 藤原 등²⁾은 慢性 B型肝炎 患者에서 HBeAg에 대한 seroconversion의 자연 경과가 年 5%인 점에 반해 小柴胡湯의 투여로 10%, seronegative까지 포함하면 28.8%로 나타남을 보고하였다. 또한 藤原등은 小柴胡湯 投與가 肝機能을 회복시키며, 사람의 正常 線維芽細胞 由來의 天然型 IFN β 와 병용 투여가 더욱 효과적임을 보고하였으며, 熊谷등³⁾은 柴胡에 함유된 사이코사포닌 및 柴胡湯이 慢性肝炎 치료에 效果가 있음을 보고하였다.

그리고 田 등⁴⁾이 CC14에 의한 肝損傷 회복에 대하여, 金 등⁵⁾이 Thioacetamide에 의한 肝損傷 회복에 대하여, 李 등⁶⁾은 膽道結紮로 유도된 간손상 회복에 대하여 報告하여 주로 肝疾患治療, 解熱, 鎮痛등에 多用되었으나 穀芽枳實小柴胡湯에 대한 研究가 미진해서 이를 이용하여 항산화기전에 의한 간보호 작용을 관찰하였다.

모든 好氣性 有機體는 代謝過程을 통해 98%의 산소는 정상적인 호흡과정에

Table 7. Influence of t-BHP and *Gokajisilsoho-Tang*(GJST) extracts on the secretion of reduced GSH and oxidized glutathione(GSSG) into the culture medium

Concentration GJST Extract(μ g/ml)	Glutathione released into the culture medium(nmol/mg protein)			
	t-BHP 0 μ M		t-BHP 500 μ M	
	GSH	GSSGG	GSH	GSSG
CONT	1.65 \pm 0.17	0.26 \pm 0.03	0.96 \pm 0.05	2.54 \pm 0.21
20	1.63 \pm 0.19	0.28 \pm 0.05	1.24 \pm 0.09	2.26 \pm 0.22
40	1.64 \pm 0.21	0.24 \pm 0.03	1.28 \pm 0.10	2.15 \pm 0.19
80	1.60 \pm 0.19	0.26 \pm 0.04	1.49 \pm 0.14*	1.56 \pm 0.18*
160	1.66 \pm 0.18	0.23 \pm 0.03	1.55 \pm 0.12**	1.13 \pm 0.22*
320	1.68 \pm 0.15	0.30 \pm 0.03	1.61 \pm 0.13**	0.94 \pm 0.11**

The value represents the mean \pm SE of 6 samples. P value denotes the difference from control. * : p<0.05, ** : p<0.01.

서 물로 바뀌 小便 등으로 排出시키나, 약 2%의 산소는 물로 변하지 않고 不完全한 상태로 머무르게 된다. 이때 化學的으로 反應性이 큰 有害 活性酸素나 유리기(free radical)가 생기는데 이 活性酸素와 유리기는 생체 내에서 DNA 합성에 해를 끼치며 지질의 과산화로 인한 세포막의 손상을 가져올 수 있으며, 특히 病理的인 조건하에서 反應性이 강한 活性酸素들은 肝損傷, 癌, 炎症, 動脈硬化, 癡呆 및 老化등 退行性 疾病을 誘發시킨다고 알려져 있다.

우리 몸은 산소를 수반한 정상적인 생화학반응 과정에서도 유리기를 생성할 뿐만 아니라 생체 밖에서 들어온 공해물질, 흡연시 발생하는 여러 물질, 발암물질, 특정 항생제, 광선(자외선), 열, 특정금속, 방사선 등으로 부터도 생길 수 있다. 따라서 만약 활성산소들을 효과적으로 제거시키거나 생성을 억제하는 항산화제를 개발할 수 있다면 인간을 여러 질병으로부터 구할 수 있다.

이러한 활성산소에 의한 세포괴사 및 관련 질병을 예방하기 위하여 효소 항산화제 (Enzymatic Antioxidant) 및 비효소 항산화제 (Nonenzymatic

Antioxidant)들의 임상효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 그에 부응하여 항산화 효소들을 이용한 항산화 치료제 개발연구가 계속 시도되고 있으나 아직까지 괄목할 만한 연구 결과는 없는 실정이다.

한편 穀芽枳實小柴胡湯, 小柴胡湯등의 肝疾患 治療에 쓰이는 處方이 抗氧化作用등의 機轉으로 肝機能 保護作用을 할 것으로 추측되나 이러한 가정에 대한 구체적인 증거는 거의 없는 실정 이기에 이러한 것을 설명할 방법으로 培養肝細胞를 이용하여 실험을 하였다. 培養肝細胞는 여러 가지 약물대사에 대한 연구를 하는데 중요한 방법으로 여겨지며, 여러 화합물로 유발되는 산화적 손상의 연구에 많이 이용되어진다. t-BHP나 reactive oxygen species등에 대한 노출로 유발된 산화적 손상과 관련하여 이러한 培養 시스템은 簡便性, 再現性등의 여러 가지 이점을 제공한다. 이러한 이점 중에서 培養肝細胞는 分離된 肝細胞가 分離過程에서 중요한 보호 작용 분자들의 손실을 완전히 회복하지 못하는데 비하여 GSH level을 높게 유지하는 것을 보인다. 또한 초기 배양기간

동안에는 cytochrome P450 활성도의 손실이 거의 없으므로 培養肝細胞는 여러 가지 약물의 정상 대사를 수행할 능력을 보유하고 있는 것이다. 이러한 점은 여러 가지 물질이 복합적으로 존재하여 기능을 발휘하는 것으로 생각되는 한약재의 평가에 매우 중요한 의미를 지니는 것이다. 본 실험에서 사용한 실험적인 배양 시스템은 이러한 기준을 충족하는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 이러한 肝細胞 培養方法을 통하여 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物이 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)에 반응하여¹⁹⁾ 발생한 細胞毒性和 脂質過酸化物的 과다생성, 핵산 및 단백질 合成能의 변화, glutathione 含量的 변화에 미치는 影響을 觀察하였다.

각각의 분자나 복합적인 구성성분을 가지는 약물의 항산화특성을 평가하는데 중요한 점의 하나는 이러한 물질을 培養細胞에 투여하였을 때 나타나는 細胞毒性에 관한 평가이다. 이에 본 연구에서는 활성산소의 일종인 t-BHP에 의한 산화적 손상의 모델을 이용하여 여기에 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 투여하여 lactate dehydrogenase(LDH) 누출 및 MTT assay에 의한 세포활성도의 변화를 조사하였다. LDH는 생체내의 해당계 최종 단계에서 lactate를 pyruvic acid로 전환시키는 과정에 관여하며 세포 손상시 투과성이 增加된 細胞膜을 통하여 細胞로부터 漏出되는 細胞내의 효소로, LDH의 측정은 세포 손상의 정도를 판정하는 기준이 된다.

Tert-butylhydroperoxide(t-BHP)가 培養肝細胞에서 細胞損傷을 유발하게 되면 細胞培養液內의 LDH 漏出이 농도와 시간경과에 따라 增加되는 것을 觀察할 수 있었으며, 이러한 결과는 다른 연구자들의 報告와 일치하고 있다¹⁹⁾.

본 실험에서는 培養肝細胞에 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 加하여 배양한 결과 세포독성으로 인한 LDH 漏出이 크게 변하지 않아 穀芽枳實小柴胡湯의 세포독성을 배제할 수 있었다. 또한 t-BHP로 유발된 細胞의 LDH의 세포의 누출의 增加가 穀芽枳實小柴胡湯의 투여로 현저히 抑制되는 결과를 보였다. 이는 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 세포손상 억제효과를 간접적으로 보여주는 것이라 할 수 있다. 또한 MTT assay를 통하여 培養肝細胞를 t-BHP에 노출시킨 결과 농도의존적으로 細胞의 활성도가 현저히 減少하였고, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 처리후에는 세포활성도의 減少가 抑制되는 效果를 觀察할 수 있었다. MTT는 연한 노란색의 기질로서 살아있는 細胞를 培養할 때 진한 blue formazan 생성물을 만든다. MTT는 활성화된 mitochondria에 의해서만 만들어지기 때문에 MTT assay에 의해서 측정되어 t-BHP로 유발된 세포활성도의 減少는 t-BHP가 培養肝細胞의 mitochondria에 損傷을 주었다는 것을 의미하며, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物로 培養肝細胞를 전처리하면 MTT formazan의 양이 增加하는 것은 이러한 細胞의 mitochondria의 損傷이 어느 정도 회복되었다는 것을 본 실험에서 보여준 것으로, 이것은 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物이 t-BHP로 細胞損傷에 어느 정도의 방어 효과가 있다는 것을 나타낸 것이라 할 수 있다.

고도의 불포화지방산으로 이루어진 인지질은 각종 활성산소 등의 공격을 쉽게 받아 脂質過酸化 반응이 일어나서 hydroperoxide를 생성하게 된다. 이 過酸化물은 각종 radical과 반응하여 다양한 이차 생성물을 만들게 되는데, 그 중에는 많은 細胞毒性物質이 포함되어 있

으며 이러한 脂質過酸化 반응은 다시 인접 부위의 불포화지방산의 과산화반응을 유도하여 또 다른 過酸化脂質을 생성케 하는 연쇄적인 반응이 지속되면서 세포막의 붕괴 및 괴사에 이르게 되고 조직 및 기관의 기능 손실, 조직 손상을 초래할 뿐만 아니라 각종 난치질환의 병인, 약물을 포함한 여러 화합물에 의한 毒性 및 노화와 암에 이르기까지 많은 질환의 원인으로 밝혀지고 있다. 따라서 脂質過酸化 반응에 있어서 過酸化脂質의 정량은 병태 생리학적으로 중요하게 인식되고 있다. 따라서 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 細胞損傷 抑制機轉을 분명하게 확인하기 위하여 t-BHP로 유발한 脂質過酸化량을 측정하였다. 過酸化脂質의 양은 일반적으로 thiobarbituric acid(TBA)법으로 측정하는데, 過酸化脂質로부터 유래하는 malondialdehyde(MDA)가 protein 존재하에서 TBA와 반응하면 복합체를 형성하는 원리에 의한 것으로 TBA 반응물질인 MDA는 脂質過酸化의 형성 지표로 사용된다. 脂質過酸化 산물인 MDA의 含量이 增加되면 細胞의 산화적 손상을 초래하고 단백질이나 脂質에 결합하여 이들을 서로 cross-linking시켜서 중합반응을 일으키는데, 이러한 반응은 세포막의 변형성, 이온수송, 효소활성과 세포표면결정기의 응집상태 등 細胞內膜의 특성을 변화시킬 뿐만 아니라, 극한 상태에서 過酸化된 세포막은 응집력을 잃게 되고 수용성 脂質過酸化產物은 다른 細胞內 소기관으로 확산하게 된다. 또한, 脂質過酸化 산물은 DNA adduct를 형성하며 DNA에 돌연변이와 유전자 발현양상을 변화시키고 細胞의 생존능력에 손상을 입혀서, 결국 활성산소에 의한 過酸化脂質의 축적 및 생성은 動脈硬化症, 虛血性 再灌

流 뿐만 아니라 老化, 癌 등을 포함한 많은 병리학적 조건을 만들어내는 機轉으로 이해된다. 이를 뒷받침하는 실험적 연구로 Player 등²⁰⁾은 흰쥐의 肝에서 誘發된 脂質過酸化가 나이에 따라 增加한다고 하였으며, Farooqui 등²¹⁾은 흰쥐의 肝, 腎, 心, 肺, 腦 및 脾臟의 均質液에서 MDA의 양이 나이에 따라 增加된다고 하였고, Yagi²²⁾는 연령이 增加함에 따라 過酸化脂質의 含量이 비례적으로 增加된다고 하였으며, 王은 노년군의 경우 脂質過酸化 含量이 청년군에 비하여 약 1.5배 정도의 含量 增加 현상이 觀察된다고 하여 일치된 의견을 보였고, Yu 등²³⁾은 미토콘드리아와 마이크로솜에서 誘發된 脂質過酸化가 나이에 따라 增加하되 특히, 마이크로솜에 의한 O₂의 소모가 같이 증가된다고 하여 나이의 增加에 따라 過酸化脂質 뿐만 아니라 활성 산소의 발생 또한 증가되고 있음을 報告하였다. 그러나, 생성된 MDA가 aldehyde dehydrogenase 등의 효소에 의해서 CO₂로 분해되어 체외로 배출될 수 있을 뿐만 아니라, 중합 반응에 참여한 MDA는 TBA assay에서 측정되지 않을 가능성이 높기 때문에 脂質過酸化의 여러 단계의 산물들과 분해효소 및 抗氧化劑 투여에 따른 반응을 동시에 측정함으로써 이들의 상호 관련성에 대한 폭넓은 觀察이 필요하다. 본 연구에서는 培養肝細胞에 t-BHP가 脂質過酸化를 有意性있게 증가시켰으며, t-BHP로 처리하기 전에 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物로 培養肝細胞를 前 處理하면 t-BHP에 의하여 誘發되는 過酸化脂質의 생성을 有意性있게 억제시키는 결과를 觀察할 수 있었다. 이것은 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物이 hydro peroxides로 誘發되는 脂質過酸化에 관여하는 여러 가지 機轉에 影響을 미쳐 MDA의 생성을

상당한 정도로 환원시킬 수 있는 것으로 생각되며, 이것은 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物이 단지 배양액내의 peroxides와의 반응을 抑制하는 간단한 機轉으로 誘發되는 것은 아닐 것으로 생각되며, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 추출과정에 穀芽枳實小柴胡湯에 원래 있을 것으로 추측되는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 등의 活性이 없어졌을 것으로 사료된다. 이러한 이유로 穀芽枳實小柴胡湯의 抗氧化의 작용은 부분적으로 일시적인 알칼리화에 의하여 이루어질 수도 있을 것이나 자세한 것은 더욱 연구를 진행하여야 할 것이다.

또한 培養肝細胞의 GSH level은 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 투여로 줄어들지 않았으며, hydroperoxides의 투여로 나타나는 GSH의 손실을 抑制하는 효과를 보였다. 이것은 hydroperoxides로 유발되는 GSH의 산화와 細胞로부터 유리되는 GSSG가 서로 반작용하여 중화하며, 반면에 GSH의 합성은 影響을 받지 않는다는 것을 의미해주는 것이다. 이러한 것은 배양액내로 유리되는 GSSG를 측정하므로써 확인할 수 있는 것이며, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 투여가 hydroperoxides에 노출된 細胞의 GSH level을 견고하게 유지시켜 주는 것이다. 이러한 현상은 GSH의 산화를 직접적으로 抑制하는 것으로 설명하기는 어렵지만, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物이 GSH의 재합성이 촉진되거나 oxidative stress가 增加하는 상황에서 GSSG의 漏出이 減少된다는 것을 의미하는 것으로 생각된다.

또한, 활성 산소에 의해서 지질뿐만 아니라 단백질과 핵산도 쉽게 산화되는데 특히, 지질과 단백질은 생체막에 같이 존재하면서 서로간에 긴밀한 관계를

유지하고 있으므로 만일 지질이 산화되면 지질의 peroxy radical과 이의 분해 중간물인 여러 종류의 aldehyde들이 인접한 단백질을 직접 산화시키게 되고 간접적으로는 지질막의 유동성이 떨어져서 이차적으로 막결합 단백질의 구조와 기능에 영향을 미치게 되는데, 실험적 연구로는 Oliver 등²⁴⁾이 단백질의 산화는 세포노화시 효소 활성 감소로 인한 것이라 하여 단백질 산화와 노화의 관련성을 報告한 바 있다. 따라서 본 실험에서는 培養肝細胞에 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 투여하여 培養한 다음 동시에 ³[H]-thymidine을 투여하여 培養한 후 DNA 合成량을 조사하였으며, t-BHP로 損傷된 培養肝細胞의 總蛋白質 合成량의 변화를 측정하였는데, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物이 농도의존적으로 핵산 합성을 增加시켰으며, t-BHP로 減少하는 總蛋白質 合成량을 有意性있게 회복시키는 효과를 觀察할 수 있었다.

이상의 결과를 고려하면 t-BHP에 의하여 유발되는 培養肝細胞의 細胞損傷은 細胞膜을 통하여 세포로부터 LDH를 漏出시키고 세포의 활성도가 減少하게 되며, 결국 細胞膜의 脂質過酸化를 유발하는 동시에 總蛋白質 合成량을 減少시키는 데, 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物의 處理는 이러한 LDH의 누출과 세포의 活性度 減少 및 脂質過酸化를 방지하고, GSH의 含量을 강화하고, 總蛋白質 合成량의 減少를 어느 정도 抑制시키는 효능이 있음을 알 수 있었으나 그 정확한 機轉에 대한 연구는 더 필요할 것으로 여겨진다. 즉 穀芽枳實小柴胡湯이 활성 산소에 의해 손상된 肝損傷을 회복시키고 여러 가지 損傷機轉을 抑制시키며, 過酸化脂質의 생성을 줄이고 GSH의 含量을 강화하는 것으로 미루어 抗氧化작용에 기인한 肝細胞損傷의 억제

에 이용 가능할 것으로 여겨지며, 구체적인 抗酸化 防禦機轉의 究明과 함께 유효한 성분 분석 등에 관하여 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결론적으로 free radicals은 內毒素 處理 동물에서 肝損傷의 機轉을 설명하는 중요한 요소이며, 본 실험에서 수행한 內毒素 處理 白鼠에서 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物이 內毒素 處理 白鼠의 사망률 감소와 transaminases의 增加 抑制 및 GSH등의 活性維持등의 效果를 보이는 것은 肝組織損傷을 誘發하는 酸化的 機轉을 抑制하는 效果에 의한 것으로 생각된다.

V. 結 論

穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 t-BHP로 처리한 白鼠의 培養肝細胞에 투여하여 LDH 누출, 세포활성도, 지질과산화에 미치는 영향 등을 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物은 모든 실험 결과에서 세포 독성 효과를 나타내지 않았다.
2. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 t-BHP 처리한 배양간세포 실험군에 투여한 결과 160 $\mu\text{g/ml}$, 320 $\mu\text{g/ml}$ 抽出物의 농도에 따라 유의성있게 LDH의 누출량이 점차 감소하였다.
3. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 t-BHP 처리한 배양간세포 실험군에 투여한 결과 抽出物 농도가 160 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 세포활성감소 억제효과가 나타났다.
4. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 t-BHP 처리한 배양간세포 실험군에 투여한 결과 추출물의 투여 농도에 의존적으로 TBARS가 감소하였으며 특히 80 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 유의성있게 감소하였다.
5. 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物을 t-

BHP 처리한 배양간세포 실험군에 투여한 결과 총단백질 합성량의 감소정도가 억제되는 경향을 나타내었고, 또한 GSH함량의 감소를 억제시켰다.

이상의 결과로 穀芽枳實小柴胡湯 抽出物은 세포 독성이 없었으며 肝細胞損傷을 誘發하는 산화적 기전을 用量에 依存的으로 억제하는 효과를 보여 간보호 작용이 있는 것으로 思料되나, 보다 正確한 기전을 究明하기 위한 藥理學的 研究가 追加되어야 할 것이다.

VI. 參考文獻

1. 徐春甫 : 古今醫統秘方大全, 서울: 金剛出版社, 1982; 1832.
2. 牧坂泰治ほか : 慢性肝炎に對する小柴胡湯桂枝茯苓丸の治療效果, 臨床と研究 1980;57: 3803.
3. 熊谷 明, 山本昌弘 : 柴胡湯およびサイコサボンによる 慢性肝炎治療の試み, 漢方醫學 1983;7: 60.
4. Galley F.H, J. M. and Webster R.N. : Ascorbyl Radical Formation in Patients with Sepsis. Effect of Ascorbate Loading. Free Radical Biol. Med 1996;20: 139-143.
5. Rojas C, Cadenas S, Herrero A, Mendez J, and Barja G. : Endotoxin Depletes Ascorbate in the Guinea Pig Heart. Protective Effects of Vitamins C and E Against Oxidative Stress, Life Sci. 1996;8 : 649-657.
6. Shibayama Y, and Nakata K. : Effect of Exogenous Antioxidant Enzymes and Antioxidants on the Development of Endotoxin-Induced Hepatocellular Necrosis in Rats, Exp. Toxicol. Pathol. 1993;5 : 337-340.
7. Minamiyama Y., Yoshikawa T., Tanigawa T., Takahashi S., Naito Y., Ichikawa H., and Kondo M. : Antioxidative Effects of Processed Grain Food, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 1994;40 : 467-477.
8. Gebhardt r. : Improved drug metabolizing capacity of hepatocytes cocultured with epithelial cells and

maintained in a Perifusion system. In Alternatives to Animal Testing (Ch. Reinhard, Ed.), Verlag Chemie, Weinheim New York, 1994; 141-146.

9. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods 1983; 65:55-63.
10. Yagi K. : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem. Med 1976;15 : 212-216.
11. Buege J. A, Aust S.D. : Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzy mol 1978; 52 : 302-310.
12. Tietze F. : Enzymic Method for quantitative determination of nano gram amounts of total and oxidized glutathione : Applications to mammalian blood and other tissues. Anal. Biochem 1969; 27 : 502-522.
13. Ellman G.L. : Tissue Sulphydryl Groups. Arch. Biochem. Biophys 1959; 82 : 70-77.
14. Jaeschke H, Mitchell J.R. : Use of isolated perfused organs in hypoxia and ischemia/reperfusion oxidant stress. Methods Enzymol 1990;186 : 752-759.
15. 藤原研司, 持田 智 : B型慢性肝炎に對する小柴胡湯のHBe抗原・抗體系への果, 肝炎・増補C型肝炎, 改訂第2版. 南江堂, 1993; 164.
16. 田賢哲 外 : 膈下逐瘀湯 煎湯液이 CC14로 誘發된 白鼠 肝損傷에 關한 研究. 慶熙韓醫大 論文集 1979;2: 73.
17. 金漢燮 : 薺菜가 TAA 中毒 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響. 大邱: 大邱韓醫科大學院, 1990.
18. 李建穆 : 加減茵陳蒿湯 水針液이 膽道結紮로 誘發된 肝損傷에 미치는 影響. 大田: 大田韓醫科大學院, 1993.
19. Gebhardt R. : Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the Artichoke(Cynara scolymus L.) against hydroperoxide induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. 1997.
19. Hart C. M, Tolson J. K, Block E. R. : Supplemental fatty acids alter lipid peroxidation and oxidant injury in endothelial cells. Am. J. Physiol 1991; 206 : 481-488.

20. Player T. J, Mills D. J, Horton A. A. : Age-dependent changes in rat liver microsomal and mitochondrial NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 78 : 135-141.
21. Farooqui M. Y, Day W. W, Zamorano D. M. : Gluthathione and lipid peroxidation in the aging rat *Comp. Biochem. Physiol* 1987; 88 : 214-219.
22. Yagi K. : Lipid peroxides and diseases. *Chem. and Phys. of Lipid* 1987; 45 : 337-342.
23. Yu B. P, Suescun E, Yang S. Y. : Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase. *Mech. Ageing Dev* 1992; 65 : 17-22.
24. Oliver C. N, Ahn B, Meorman E. J, Goldstein S, Stadtman E. R. : Age-related changes in oxidated proteins. *J. Biol. Chem* 1987; 262 : 1754- 1762.