

Bromobenzene으로 유발된 흰쥐의 肝損傷에서 加味五苓散이 抗酸化 作用에 미치는 영향

김형환, 김미랑, 박철수, 김종대

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Gami-oryungsan* on Antioxidation in Rat's Liver

Hyeong-Hwan Kim, Mi-Rang Kim, Chul-Soo Park, Jong-Dae Kim

Dept. of Oriental Medicine, Dongguk University

Objective : This is the experimental paper to investigate the effects of *Gami-oryungsan*(GO) on decreasing the activities of free radicals.

Methods : We used three different group; In the normal group, we injected *Gami-oryungsan* extract intraperitoneally daily for 15days(90mg/kg), bromobenzene(310mg/kg) for 2days and injected normal saline in the control group.

Results : We have observed the effects of *Gami-oryungsan* about the damage of rat's liver induced by bromobenzene. We can find the level of lipid peroxidation and type conversion ratio of xanthine oxidase decreased compared to the case of bromobenzene-treated group. The enzyme of activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase highly increased in *Gami-oryungsan* pre-acupunctured group compared to the group treated with only bromobenzene. The level of glutathione in *Gami-oryungsan* pre-acupunctured group was increased as highly as normal group. Also it was not seen special effects concerning aldehyde oxidase.

Conclusions : *Gami-oryungsan* extract recovers the damage of liver due to bromobenzene intoxication by decreasing the lipid peroxidation

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용된 藥材는 동국대학교 경주 한방병원에서 구입하였고 처방구성 및 1첩 분량은 다음과 같다.

2) 試藥 및 機器

Bovine serum albumin(BSA), glutathione reduced, hematoxyline, nicotineamide adenine dinucleotide (NAD), sodium chloride, sodium hydroxide, thiobarbituric acid sodium salt, tris base, xanthine sodium salt는 Sigma사로부터, nicotineamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(NADPH)은 Kohjin사, 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid),

* 加味五 散

韓藥名	生藥名	重量(g)
靈芝	<i>Ganoderma lucidum</i> KARST	12g
排風藤	<i>Solanum lyratum</i> THUNB	12g
柳根皮	<i>Uimus propinqua</i> KOIDZ	6g
澤瀉	<i>Alisma plantagy-aguatica</i> var. <i>orientala</i> SAMUELS	6g
白茯苓	<i>Poria cocos</i> WOLF	4g
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ	4g
豬苓	<i>Polyporus umbellatus</i> FRIES	4g
肉桂	<i>Cinnamornum cassia</i> PRESL	4g
柴胡	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	4g
總量		56g

2. 方法

1) 抽出液의 調製

加味五苓散 15첩(810g) 분량에 3배량의 증류수를 가한 다음 100℃에서 3시간 동안 1회 추출하여 여과하고 농축하여 동결건조한 후 加味五苓散 抽出物 165g을 얻었다.

함)를 가하여 氷冷하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상정액을 얻었다. 이것을 이용하여 과산화지질의 함량 및 glutathione 함량을 측정하였다. 상정액을 다시 10,000×g

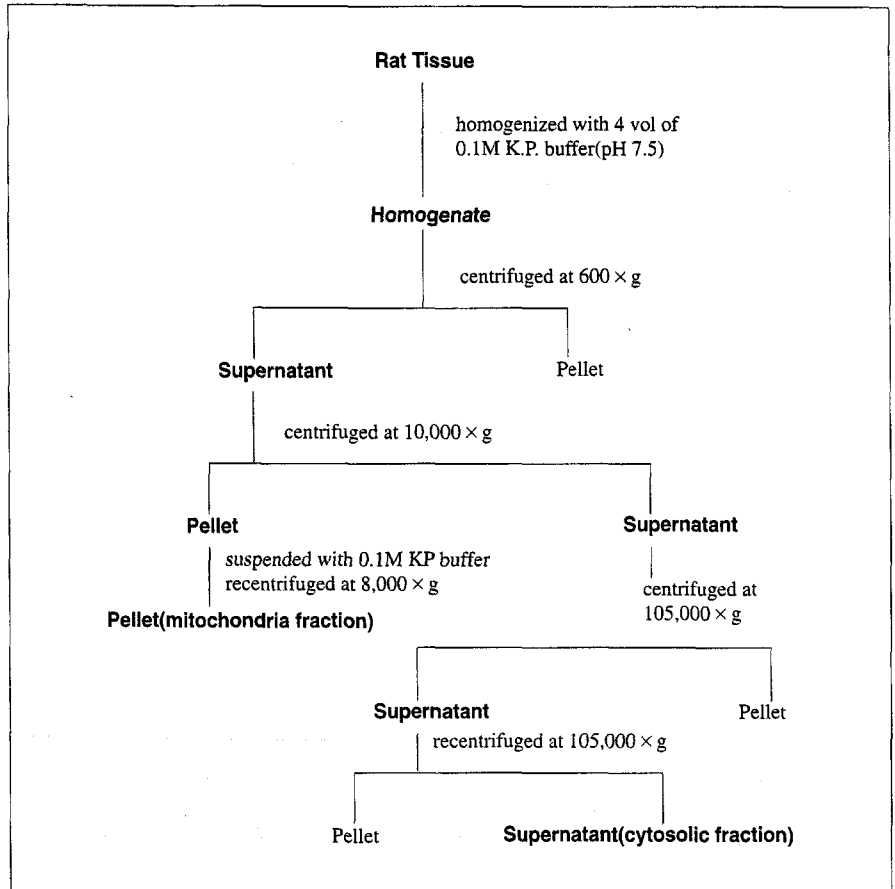
정은 Stirpe 등의 방법⁸⁾에 준해 0.1M K.P. buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60 M 및 효소원을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리 하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 한편 xanthine dehydrogenase(type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD⁺ 100mM을 첨가해 동일하게 반응시킨 다음 측정하여 나온 활성도(total type: type D+O)에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다. 한편 xanthine 산화 효소의 형전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine 산화 효소 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase(type D)에서 xanthine oxidase(type O)로의 형전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

② Aldehyde oxidase 활성 측정

Aldehyde oxidase 활성 측정은 Rajagypalan 등의 방법⁹⁾에 의해 0.1M K.P. buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 N-1-methylnicotinamide 1.5mM과 효소액을 첨가해 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid (TCA)를 가해 반응을 종료시켰다. 반응 종료후 생성된 pyridone을 파장 300nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

③ Catalase 활성 측정

Catalase 활성 측정은 Aebi의 방법¹⁰⁾에 준해 50mM K.P. buffer(pH 6.8)에



Schem 1. Preparation of enzyme source

기질인 H₂O₂ 10.5mM 및 mitochondria 효소액을 첨가하여 최종 반응액이 3.0ml가 되게하였다. 이 반응액을 25℃에서 30초간 반응시키면서 240nm에서 H₂O₂의 분해정도를 측정하여 분자 흡광계수(E₂₄₀=0.041mM⁻¹cm⁻¹)를 이용하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 분해시킨 H₂O₂의 양을mole로 나타내었다.

④ Glutathione peroxidase 활성 측정

Glutathione peroxidase 활성 측정은 Paglia 등의 방법¹¹⁾에 준해 일정량의 0.1M Tris HCl buffer(pH 7.2) 용액에 기질인 H₂O₂, 1mM glutathione, glutathione reductase(2 I.U.), 0.2mM NADPH 및 효소원을 첨가하여 25℃

에서 5분간 반응시키는 동안에 생성되는 GSSG를 환원시키는데 소비된 NADPH의 함량을 340nm에서 측정하여 그 활성을 산정하였다. 효소의 활성은 1분당 1mg의 단백질이 산화시킨 NADPH의 양을 nmole로 나타내었다.

⑤ Superoxide dismutase 활성 측정

Superoxide dismutase 활성 측정은 Martin 등의 방법¹²⁾에 준해 실시하였다. 효소원 조제 방법에 따라 분리된 cytosolic fraction에 EtOH:CHCl₃ (5:3)혼액 0.4배량을 가하여 잘 혼합한 다음 10,000 x g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 얻고 이것을 superoxide dismutase 활성 측정 효소원으로 사용하였다. 반응액은 50mM K.P. buffer (pH 7.5, EDTA 0.1mM 함유) 일정량

에 5mM hematoxylin, 효소액의 용량을 달리하여 첨가하고 최종 반응액이 3.0ml가 되게하였다. 이 반응액을 25℃에서 5분간 반응시킨 다음 560nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성을 산정하였다. 효소 활성의 unit는 효소를 넣지않고 반응시킨 5 mM hematoxylin 액의 흡광도 증가를 50%억제하는 단백질의 양으로 산정하였다.

5) 과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법¹³⁾에 준해 간, 신 및 뇌조직 마쇄 균질액 일정량에 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95℃에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol:Pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1g당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

6) Glutathione 함량 측정

조직중 glutathione 함량 측정은 Ellman의 방법¹⁴⁾에 준해 조직 마쇄액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 가해 제단백시켜 얻은 상정액 일정량에 0.1mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 함유한 0.1M sodium phosphate buffer(pH 8) 일정량을 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol의 흡광도를 파장 412nm에서 측정하여 농도를 산정하였다. GSH 함량은 조직 1g 당 함유되어 있는 GSH의 양을 μmole로 나타내었다.

7) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법¹⁵⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다. 한편 실험 결과의 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 상호 비교하였다.

III. 實驗成績

1. 加味五苓散 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 脂質의 過酸化에 대한 影響

생리식염수만을 주사한 정상군의 過酸化脂質 含量은 17.35±1.79 nmoles/g of tissue였고 bromobenzene을 주사하여 肝毒性을 유발시킨 對照群은

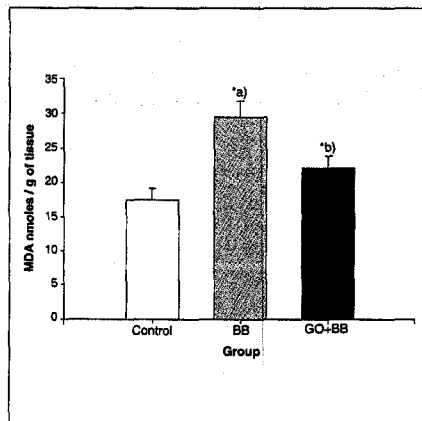


Fig. 1. Effect of the extract of GO on the hepatic lipid peroxide level in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90 mg/kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310 mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals. a) Significantly different from control group, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (*P:<0.05, GO:Gami-oryung san). BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

29.42±2.19 nmoles/g of tissue으로 나타나 正常群에 비해 약 2배 정도의 현저한 함량증가 현상이 관찰되었다. 그러나 15일간 加味五苓散을 주사한 군은 21.79±1.99 nmoles/g of tissue로 나타나 前處置를 하지 않은 군에 비하여 過酸化脂質의 생성이 유의성 있게 抑制되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

2. 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 xanthine oxidase 활성에 대한 影響

正常群에서 type O의 활성이 0.38±0.02 nmol 이었으나 bromobenzene으로 肝臟의 毒性을 유발한 對照群은 0.59±0.03 nmol 로서 正常群에 비해

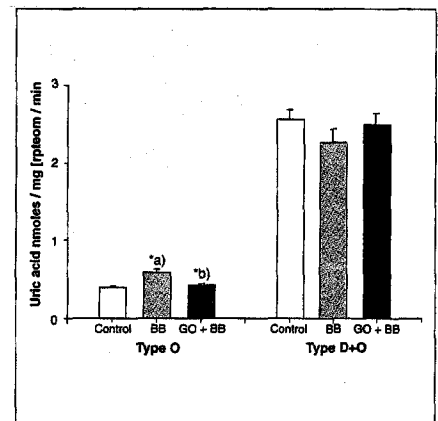


Fig. 2. Effect of the extract of GO on the hepatic xanthine oxidase activity in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90 mg/kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310 mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals. a) Significantly different from control group, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (*P:<0.05). BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

효소활성이 증가되었다. 그러나 加味五苓散을 15일간 前處置한 실험군의 경우 효소활성이 0.41 ± 0.03 nmol로서 유효성 있는 억제력을 보였다. 한편 total type의 경우는 正常群, bromobenzene을 주사한 對照群, 加味五苓散을 前處置한 實驗群 사이에 별다른 효소활성의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

3. 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 xanthine oxidase 型轉換에 대한 影響

正常群의 경우 xanthine oxidase 型轉換比가 $14.8 \pm 0.22\%$ 이었으나 bromobenzene으로 毒性을 유발한 對照群은 $26.2 \pm 0.33\%$ 로서 正常群에 비

해 型轉換이 증가되었으며 加味五苓散 製劑를 處置한 實驗群의 경우는 xanthine oxidase의 型轉換比가 약 $20.7 \pm 0.32\%$ 로 나타나 bromobenzene으로 肝毒性을 유발시킨 群보다 型轉換比가 현저하게 억제되었다(Fig. 3).

4. 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 aldehyde oxidase 활성에 대한 影響

정상 상태의 aldehyde oxidase 활성은 1.14 ± 0.10 nmol 이었지만, bromobenzene으로 인한 毒性 유발군은 효소활성이 1.16 ± 0.12 nmol로 약간 증가를 보였다. 加味五苓散 製劑를 前處置한 後 bromobenzene을 주사한 실험군의

경우 효소활성은 1.13 ± 0.11 nmol로 나타나 bromobenzene 단독 주사군에 비하여 약간의 활성억제 증상이 나타났지만 별다른 유의성은 없었다(Fig. 4).

5. 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 superoxide dismutase 활성에 대한 影響

正常群의 superoxide dismutase 활성이 4.72 ± 0.39 units/mg protein 이었으나 bromobenzene으로 肝毒性을 유발한 대조군은 1.93 ± 0.22 units/mg protein으로서 정상군에 비하여 현저한 효소활성 억제현상이 관찰되었다. 그러나 加味五苓散을 前處置한 後 bromobenzene을 주사한 군의 경우는 효

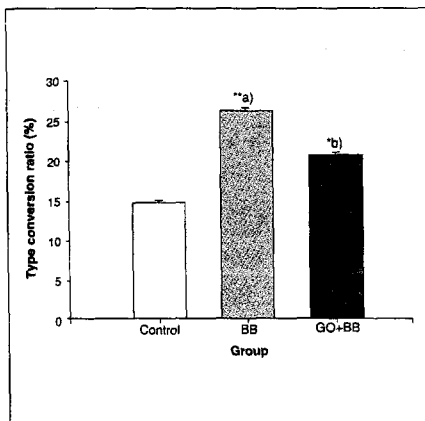


Fig. 3. Effect of the extract of GO on the type conversion of hepatic xanthine oxidase in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90mg /kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310 mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. a) Significantly different from control group, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (*P:<0.05, **P<0.01). BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

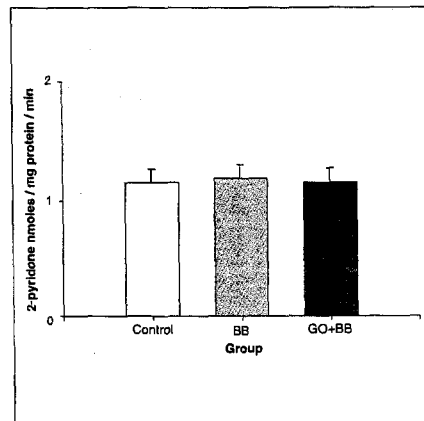


Fig. 4. Effect of the extract of GO on the hepatic aldehyde oxidase activity in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90mg/kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

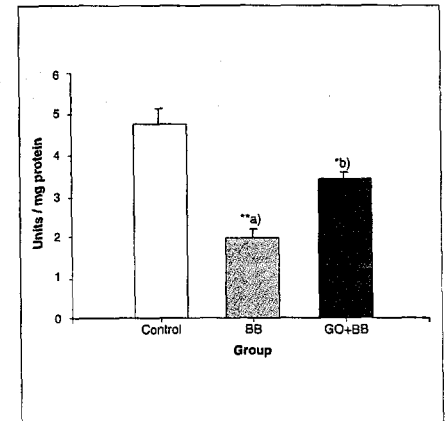


Fig. 5. Effect of the extract of GO on the hepatic superoxide dismutase activity in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90mg/kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. a) Significantly different from control group, b) Significantly different from bromobenzene-treated group (*P:<0.05, **P<0.01). BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

소활성이 3.32 ± 0.20 units/mg protein 로 나타나 bromobenzene으로 독성을 유발한 군에 비하여 효소활성이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5).

6. 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 catalase 활성에 대한 影響

정상군의 경우 catalase 활성이 1.43 ± 0.12 μ moles이었으나 bromobenzene으로 毒性을 유발한 대조군은 0.63 ± 0.07 μ moles로 나타나 정상군에 비하여 효소활성이 현저히 억제되었다. 한편 加味五苓散 製劑를 前處置한 후에 bromobenzene을 주사한 實驗群에서는 효소활성이 0.98 ± 0.08 μ moles로

나타나 前處置를 하지 않은 bromobenzene 단독 注射群에 비하여 효소활성이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6).

7. 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 glutathione peroxidase 활성에 대한 影響

정상군의 경우 glutathione peroxidase 활성이 183.9 ± 24.7 nmoles이었으나 bromobenzene으로 독성을 유발한 대조군은 129.1 ± 19.2 nmoles로 나타나 정상군에 비해 현저한 효소활성 억제현상을 나타내었다. 한편 加味五苓散 製劑를 미리 前處置한 실험군의 경우 효소활성이 165.7 ± 18.9 nmoles로 나타나 毒性 유발군에 비해 유의성

있게 회복되었다(Fig. 7).

8. 製劑 投藥後 bromobenzene 주사에 따른 glutathione 함량에 대한 影響

정상군에서 肝臟 조직중의 glutathione 함량은 5.02 ± 0.42 μ moles 이었으며 bromobenzene으로 독성을 유발시킨 대조군은 2.73 ± 0.27 μ moles로 나타나 정상에 비하여 함량 감소 현상을 보였다. 그러나 加味五苓散을 前處置한 후 肝臟의 毒性을 유발한 實驗群은 3.64 ± 0.31 μ moles로 나타나 bromobenzene에 의한 毒性 유발군에 비하여 유의성 있게 정상수준으로 개선되어지는 양상을 나타내었다(Fig. 8).

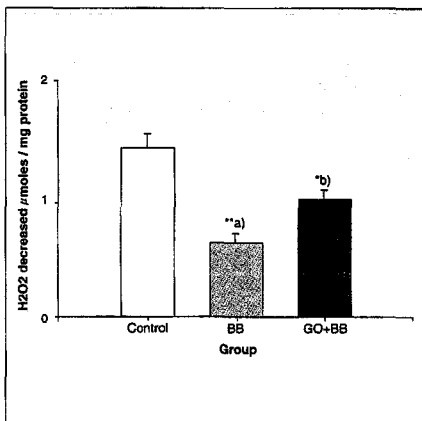


Fig. 6. Effect of the extract of GO on the hepatic catalase activity in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90mg/kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. a) Significantly different from control group, b) Significantly different from bromobenzene-treated group(*P<0.05, **P<0.01). BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

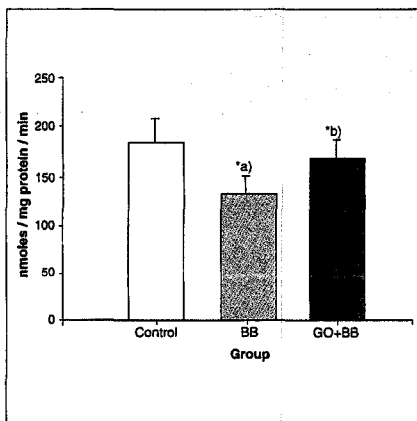


Fig. 7. Effect of the extract of GO on the hepatic cytosolic glutathione peroxidase activity in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90mg/kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. a) Significantly different from control group, b) Significantly different from bromobenzene-treated group(*P<0.05). BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

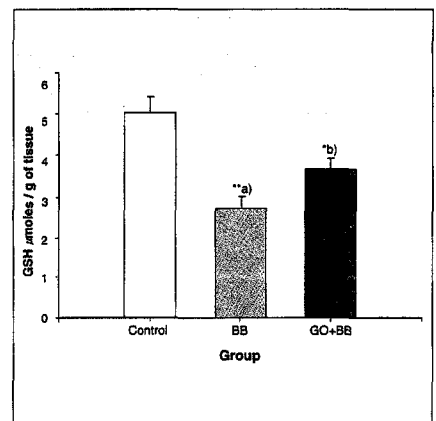


Fig. 8. Effect of the extract of GO on the hepatic glutathione level in bromobenzene-treated rats. Rats were received with GO extract(90mg/kg) intraperitoneally daily for 15days and bromobenzene(310mg/kg) for 2 days. Rats were decapitated after 16hr the last dose of bromobenzene. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. a) Significantly different from control group, b) Significantly different from bromobenzene-treated group(*P<0.05, **P<0.01). BB: bromobenzene-treated group, GO: GO extract-treated group.

IV. 考 察

活性酸素은 분자 혹은 원자의 최 외 각 전자궤도에 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 총칭하며 인체의 면역기능 및 염증,腫瘤 등의 질환과 연관성이 있고 일정한 毒性을 가지고 있으며 노화와 깊은 연관성이 있다¹⁾. 活性酸素에 의하여 세포의 손상을 초래하거나 過酸化脂質의 생성을 유도하여 질병을 유발한다³⁾. 과산화지질 생성의 원인이 되는 活性酸素類에는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등이 있으며 이러한 활성 산소는 xanthine oxidase, aldehyde oxidase, microsomal mixed function oxidase, catecholamines의 自動酸化에 의해서도 생성이 촉진된다고 한다. 반면 分解系 酵素인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등에 의해 생성이 억제된다. 인체 내에 자체적인 抗酸化作用이 있고 SOD가 그 중의 하나이며 세포막의 過酸化를 저해하고 질병의 회복과 老化防止에 중요한 작용을 하고 있다^{16,17)}.

그리고 최근 中醫에 보고된 抗酸化와 관련된 약물에 대한 보고는 많다. 過酸化脂質蛋白質은 內皮細胞와 平滑筋 細胞에 특이한 毒性作用이 있으며 疏肝理氣, 活血化瘀의 治法은 肝의 疏泄作用을 보좌하며 과산화지질의 함량을 감소시키고 SOD활성을 증가시키는 작용이 있음이 밝혀졌고 三稜, 香附子, 陳皮, 芍藥 등의 藥劑가 이와 같은 작용이 보고되었고 左歸飲, 逍遙散, 四君子湯 등의 抗酸化作用이 증명되고 있다^{18,19)}.

본 實驗은 清熱利水 작용이 있는 加味五苓散을 이용하였으며 五苓散 本方に 柴胡, 靈芝, 柳根皮, 排風藤을 가미한

처방이다. 본래 五苓散은 『仲景全書』에 처음으로 記載된 處方으로 茯苓, 澤瀉, 白朮, 肉桂 등의 藥劑로 구성되어 있으며²⁰⁾ 漢代 張의 『傷寒論』에 “太陽病 發汗後 大汗出 胃中乾 煩躁不得眠 欲得飲水者”에 사용한다고 기록되어 있고⁶⁾ 利濕熱作用이 主效能이며 臨床應用範圍로는 浮腫, 口渴, 小便不利, 惡心, 嘔吐, 眩暈, 泄瀉, 尿毒症, 糖尿病 등이 해당된다²¹⁾. 기존의 실험에서 밝힌 五苓散의 效能을 보면 <汝>는 五苓散의 治療範圍를 概略的으로 분류하면서 肝炎, 腹水 등을 治療한다고 했으며 五苓散은 電解質 失調의 조절 및 血漿量을 증가시키는 效果와 高脂肪食에 기인한 脂肪肝에 대한 效果가 있다고 보고하였다²²⁾. <金> <禹> 등의 활발한 연구로 五苓散에 가미된 처방이 肝損傷後 肝機能 改善에 效果가 있음을 보고하였다²³⁾.

五苓散은 張의 『傷寒論』에 최초로 立方되어 外有表症하고 內停水濕한 症을 治한다고 하였으며, 汪은 方劑意義가 化氣利水の 代表的 處方이라 하였는데 근래에는 利水滲濕의 效를 취하여 水濕內停의 症에 흔히 활용되고 있다^{24,25)}. 宋代의 太平惠民和劑局方에는 “治傷寒 溫熱病 表裏不解 頭痛 發熱 口燥咽乾 煩渴 飲水 或水入即吐 或小便不利 及汗出表解 煩渴不止者”이라 하여 水濕으로 인한 諸疾患의 治療에 응용되었다²⁶⁾. 加減된 藥物중 排風藤은 가지과에 속하며 異名은 白草, 谷菜, 白毛藤 등이고²⁷⁾ 藥理作用은 清熱利濕, 解毒消腫, 抗癌作用, 消炎鎮痛 등이 있으며 適應症은 肺癌, 胃癌, 膀胱癌, 絨毛癌, 肝癌, 慢性肝炎, 膽囊炎, 乳腺炎 등이 속한다²⁸⁾. 야생하거나 재배되는 다년생 초본으로 과실은 직경 8mm 정도의 작은 열매이며 성숙하면 적색을 띠게 된다. 중국의 상하이 지역에서 전통적으로 여러 가지 癌

治療에 사용되어 왔고 민간에서는 해열 진통제로 사용해 왔는데 解毒, 抗腫瘍作用과 急性 黃疸性 肝炎, 류마티스성 關節痛, 水腫, 淋病 등에 대하여 치료 效果가 있는 것으로 기재되어 있다²⁹⁾.

柴胡는 繖形科에 속한 다년생 초본으로 性味는 微寒無毒 味苦하고 歸經은 肝膽經이고 效能은 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣이고 主治는 感冒發熱, 寒熱往來, 胸滿脇痛, 口苦耳聾, 頭痛目眩, 瘧疾, 下利脫肛, 月經不調, 子宮下垂 등이 속한다³⁰⁾. 『本草綱目』에 “主腹部胃腸結氣, 飲食積聚, 寒熱邪氣, 推陳致新. 治傷寒餘熱, 治小兒陰虛內熱, 治虛勞發熱, 治濕熱黃疸, 治因熱入臟腑引起的痢疾”이라 하였다³¹⁾.

靈芝는 구멍쟁이버섯과에 속하며 性味는 微溫無毒味甘微苦하고 歸經은 心脾肺肝腎經이며 效能은 安心安神, 補氣益血, 止咳平喘, 滋補強壯, 解毒收斂, 消積이고 主治는 失眠多夢, 心悸怔忡, 健忘, 肺虛久咳, 咳喘, 高血壓, 高脂血症, 肝炎 등이 속한다³⁰⁾. 또한 중추신경계, 심혈관계, 호흡기계 질환에 유효하며 抗癌과 免疫增強효과가 있는 것으로 증명되고 있다^{32,33)}.

榆根皮는 느릅나무과에 속한 낙엽교목인 느릅나무의 樹皮 및 根皮로서 甘滑下降한 성미를 가지고 歸經은 大小腸膀胱經이며 效능은 行經脈, 利諸竅, 通二便, 滲濕熱, 滑胎產, 下有形留著之物이고 主治는 治五淋腫滿, 喘嗽不眠, 療疥癬禿瘡, 消赤腫妬乳 등이 속한다. 異名으로는 榆白皮, 零榆, 白榆, 榆錢樹 등이 있다^{34,35)}. 이와 같이 가감된 처방은 方劑의 意義가 化氣利水の 대표적 處方이라 할 수 있고 근래에는 利水滲濕의 效를 취하여 水濕內停의 症에 흔히 활용되고 있다. 실험적으로도 利尿作用 水分代謝 抗潰瘍作用 肝脂質抑制作用 등이 보고

된바 있고 그 임상적 활용범위가 대단히 넓다³⁶⁾.

간은 체내에서 가장 대사율이 높은 장기의 하나로서 호르몬 및 약물을 대사 하는 주된 장소이다. 간장의 microsome내에 존재하는 효소 반응과정에서 free-radical로 불리는 극히 반응성이 큰 중간 대사물이 생기고 잘 처리되지 않아 과산화지질이 과잉 형성된다. 과산화지질은 지질의 세포막변성과 효소 반응계에서 중요한 역할을 하는 효소들을 비활성화 시킨다³⁷⁾. 만성 肝疾患중 만성 활동성 간염에서 脂質過酸化가 활발히 일어나며 이는 조직의 심한 壞死性 炎症反應과 관계가 있음을 알 수 있었다. 다른 원인의 만성 肝疾患과 마찬가지로 이러한 脂質過酸化는 肝纖維化를 진행시키는 과정이라고 생각된다³⁸⁾. 활성산소에 의한 肝損傷은 일부 肝疾患에서는 비교적 잘 알려져 있으며 그 대표적인 예로는 알코올성 간질환, 중금속에 의한 肝損傷, 허혈-재관류 손상, 사염화탄소에 의한 肝損傷 등이다³⁹⁾. 활성산소에 의한 脂質過酸化는 肝纖維化에 중요한 역할을 하고 肝纖維化는 여러 가지 원인에 의해 간에 만성적인 손상이 지속될 때 초래되는 공통적인 반응으로 현재 인식되고 있다. 이러한 관점에서 脂質過酸化는 만성 바이러스성 肝疾患에서도 肝纖維化 과정에 관여하여 전체적인 병의 경과에 영향을 미칠 수 있음을 짐작할 수 있다⁴⁰⁾. 보고에 의하면 안정기보다는 간세포의 파괴가 많은 전격성 간질환에서 과산화지질 치가 증가한다고 하였다. 즉 급성간염, 만성 활동성 간염, 비대상성 간경변 환자에서 정상대조군보다 현저히 증가되고 만성 비활동성 간염과 대상성 간경변의 경우에는 약간 증가한다고 하였다⁴¹⁾. 과산화지질은 세포의 노화현상, 혈전현상 및 癌유

발과 관련되어 있다고 밝혀지고 간질환 환자에서 혈청 과산화지질이 증가하며 간질환의 병적 상태를 반영하여 주고 있어 진단 및 치료를 위한 지표가 되며 조기에 예후를 판정하는 데 유용하다⁴²⁾. 연구에 의하면 원인에 관계없이 모든 대상의 만성 肝疾患에서 脂質過酸化가 일어나며 이는 결국 肝纖維化에 공통적으로 관여할 것이라고 시사해주고 있으며 활성산소가 여러 가지 肝疾患에 폭넓게 영향을 미칠 것으로 예상되고 있다. 그러므로 간장에 대한 清熱利水の 治法은 人體內의 抗酸化뿐만 아니라 손상된 간세포에 유의성 있는 효과를 거둘 수 있는 것으로 여겨진다.

따라서 著者는 清熱利濕의 효능을 가진 加味五苓散이 肝臟疾患 및 抗酸化 作用에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 활성산소의 生成系와 分解系에 미치는 영향을 관찰하였다. 활성산소가 組織損傷을 유발하는 機轉중의 하나로 脂質過酸化가 알려져 있다. 여러 가지 원인에 의해 생성된 과산화수소는 환원된 철이나 구리이온과 산소기의 도움을 받아 hydroxyl radical을 형성한다. 이는 세포막에 있는 多不飽和脂肪酸과 결합하여 脂質過酸化를 초래하고 대사산물로 malondialdehyde(MDA) 등의 반응성이 높은 알데히드가 생성되어 細胞內의 단백질이나 DNA와 결합하여 손상을 주거나 일부 유전자의 전사율을 증가시킨다⁴²⁾. 산화반응이 이루어지면서 세포막이 손상을 입어 생성되는 것인데 이때 세포막의 파괴로 인한 세포 손상이 나타난다⁴³⁾. 그러므로 세포막 손상을 측정하는 방법으로 脂質의 過酸化反應을 이용할 수 있으며 xanthine oxidase는 細胞內에 존재하는 생체조직 대부분에 널리 분포하는 효소로 생체내의 정상상태에서는 이 酵素가 전자수용

체로 NAD⁺를 이용하는 type D 즉 de hydrogenase의 형태로 존재하고 있다. 가 病的인 조건이 부여되면 전자수용체로 분자상의 효소를 이용하는 oxidase (type O)의 형태로 型轉換이 이루어진다고 알려져 있다⁴⁴⁾. xanthine oxidase가 활성산소를 생성시키는 것은 바로 type O의 형태로 型轉換이 이루어져야만 가능하다. 그러므로 xanthine oxidase 활성과 이 효소의 型轉換率의 測定値는 細胞損傷과 연관성이 있다고 할 수 있다. 본 실험결과 두 가지 모두 유의성 있게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

시험관내에서 나타나는 加味五苓散의 지질의 과산화반응 억제와 xanthine oxidase 효소활성 저하가 生體內에서도 동일하게 나타나는지를 알기 위하여 다음의 실험을 시행하였다. bromobenzene은 할로겐 화합물로서 간단한 화학구조를 지니고 있으나 生體內에서는 發癌, 肝 및 腎機能 등 생체 전반적으로 毒性을 나타내는 맹독성 물질로 분류되는 물질이다⁴⁵⁾. 따라서 bromobenzene에 의해 나타나는 肝毒性을 加味五苓散이 어떻게 防禦하면서 抗酸化 作用이 있는지를 검토하기 위하여 실험동물에 bromobenzene注射後 脂質의 過酸化, xanthine oxidase 活性, xanthine oxidase 型轉換, aldehyde oxidase 活性를 측정하였고 free radical 분해계 효소들인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 glutathione 함량을 측정하였다.

측정결과 LPO, XO, XO형전환비, AO 등의 측정치가 모두 감소하였고 분해계 효소인 SOD, catalase, glutathione peroxidase, glutathione의 함량은 증가하였다. 加味五苓散 製劑는 xanthine oxidase 活性과 型轉換比의

억제를 통하여 活性酸素類의 발생을 억제시키고 아울러 이러한 작용 때문에 과산화지질의 생성이 억제되어진 것으로 생각되어진다. 活性酸素는 xanthine oxidase, aldehyde oxidase, microsomal mixed function oxidase, catecholamines의 自動酸化에 의해서도 생성이 촉진된다고 한다. 반면 분해계 酵素인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등에 의해서는 생성이 억제된다^{46,47,48}. SOD는 O₂를 毒性이 약한 H₂O₂로 환원시키며 이 H₂O₂는 peroxidase, catalase 등의 酵素에 의해 물로 환원되어 유독성代謝物로의 환원이 억제된다^{49,50}. 본 실험결과 bromobenzene 單獨으로 주사한 군에 비하여 加味五苓散을 전처치한 후 bromobenzene을 주사한 群에서 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase의 활성의 증가를 보였다. 외부에서 生體 內로 유입된 毒性物質들로부터 생체를 보호하기 위하여 생체방어 메카니즘이 동원되게 되는데 이때 가장 대표적인 防禦機轉으로서 glutathione을 들 수 있으며 이 화합물질은 3개의 아미노산으로 구성된 tripeptide로서 肝臟에서 주로 合成이 이루어지며 생체 전반적으로 분포하고 있다⁵¹. 따라서 조직중의 glutathione 함량을 측정함으로써 毒性物質에 대한 生體防禦能力을 間接적으로 측정할 수 있을 것이다. bromobenzene을 투여하여 肝毒性을 일으켜 현저하게 감소되었던 glutathione함량이 加味五苓散 抽出物 투여에 의해 含量增加를 나타내었다.

이상의 결과들을 종합해보면 加味五苓散 製劑는 生體內에서 抗酸化作用을 나타내었고 xanthine oxidase의 활성과 型轉換을 현저하게 억제시켰다. 또 活性

酸素의 자체 分解酵素인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 들의 활성도 증가시켜 주는데 효과가 있는 것으로 나타났다. 그래서 加味五苓散 抽出物은 毒性物質에 의해 억제된 生體內 기능을 정상적으로 改善시키는 효과가 있음을 입증할 수 있었으며 過酸化脂質 생성 억제현상과 活性酸素 分解系 酵素活性을 정상화시키는 효과로 보아 活性酸素에 의한 肝毒性도 현저하게 改善시키는 抗酸化作用을 지니고 있음을 시사하고 있다.

V. 結 論

加味五苓散이 肝臟組織의 損傷회복과 抗酸化에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 實驗動物에 抽出物을 투여한 후 bromobenzene으로 간손상을 일으켰을 때 過酸化脂質 含量 변화와 xanthine oxidase의 활성과 型轉換率 및 活性酸素의 자체 分解酵素인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 활성 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味五苓散 抽出物을 bromobenzene으로 肝臟傷을 일으킨 實驗動物에 주사한 후 過酸化脂質의 含量變化를 관찰하였을 때 對照群에 비하여 肝組織에서 含量감소 현상이 나타났으며 活性酸素 생성 促進酵素인 xanthine oxidase의 활성은 유의성 있게 억제되었으나 aldehyde oxidase의 활성변화는 별다른 유의성이 없었다.
2. 活性酸素의 자체 分解酵素인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 활성이 bromobenzene에 의해서 현저하게 저하되었으나 加味五苓散 抽出物의 前

處置에 의하여 正常群에 가깝게 회복되는 경향을 나타내었다.

3. bromobenzene투여에 의하여 현저하게 감소되었던 glutathione 함량은 加味五苓散 抽出物의 前處置에 의해 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과로 보아 清熱利濕의 效能을 주로하는 加味五苓散은 活性酸素 生成系 酵素의 활성을 억제하고 分解系 酵素의 活性을 증가시켜 活性酸素類의 생성을 저해하며 過酸化脂質의 생성을 억제함으로써 抗酸化作用이 있을 것으로 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 정해영. 노화 활성산소 동맥경화. 약학연구지 1991; 25(2): 110-115.
2. Cutler RG: Antioxidants aging and londevity. Free Radicals in Biology Academic Press 1984; 1: 371-424.
3. 이상진. 흰쥐의 세균성 복막염에서 항산화제의 보호효과. 대한소화기병학회지 1991; 23(4): 959-963.
4. 劑 昕. 柳茶提取物對正常小鼠血 SOD GSH-Px 及 MDA 含量的 影響. 중의학학보 1995; 6: 35.
5. 全國韓醫科大學 肝系內科學 교수 공저. 肝系內科學. 서울: 東洋醫學研究院; 1992, 164-176.
6. 張仲景. 仲景全書. 서울: 대성문화사; 1989, 156-158쪽.
7. Zampaglion N, Jollow DJ, Mitchell JR, Hamrick M and Gillette JR. Role of detoxifying enzyme in bromobenzene induced liver necrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 187: 218-227.
8. Stirpe F and Della Corte E. Theregulationofratliver xanthineoxidase, Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.
9. Rajagypalan KV, Fridovich I and Handler P. Hepatic aldehyde oxidase, I Purification and properties. *J Biol Chem* 1962; 237: 922-928.

10. Aebi H. La Catalase erythrocytaire. In: *Expos Annuels de Biochimie Medicale* 29 ieme serie. Masson & Cie (eds). Paris; 1969, 139-164.
11. Paglia ED and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70 : 158-169.
12. Martin JP, Dailey M and Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. *Arch. Biochem. Biophys* 1987; 255 : 329-336.
13. Ohkawa H, Ohishi N and Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95 : 351-358.
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82 : 70-77.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193 : 265-275.
16. 金吉燮. 腎臟組織에서 蟻蟻의 항산화 효과의 기전 연구. 대한한방내과학회지 1998; 19(1) : 446-447.
17. 彭智聰. 酸棗仁對內毒素發熱小鼠SOD降低的保護作用. 중국중약잡지 1995; 20(6) : 369, 340.
18. 范英昌. 疏肝活血方抗家兔動脈粥樣硬化過酸化損傷的實驗研究. 天津中醫學院 1996; 13(1) : 31-32.
19. 何士大. 抗酸化中藥的研究現狀. 中國中西醫結合雜誌 1996; 16(5) : 312-315.
20. 黃道연. 大方藥合編. 서울: 행림사; 1977, 104-105쪽.
21. 金惠英. 五苓散의 內科의 主治症에 대한 文獻的 考察. 大韓韓方內科學會誌 1993; 14(2) : 79-91.
22. 汝建中. 五苓散研究三十年回顧. 雲南中醫雜誌 1988; 9(5) : 43-46.
23. 禹弘楨. 茵陳五苓散과 茵陳增量한 構成方이 흰쥐 損傷肝에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌 1992; 13(1) : 234-241.
24. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울: 의성당; 1998, 266쪽.
25. 張仲景. 桂林古本 傷寒雜病論. 廣西人民出版社; 1980, 95-98쪽.
26. 宋炳基. 方證新編. 서울: 동남출판사; 1983, 412쪽.
27. 金在佶. 원색천연물대사전. 서울: 남산당; 1984, 151쪽.
28. 洪性範. 臨床抗癌中草藥. 서울: 성보사; 1990, 113-114쪽.
29. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典. 上海: 上海科學技術出版社; 1978, 1282쪽.
30. 金先熙, 李暎鍾, 安德均, 李尙仁, 盧昇鉉, 康秉秀 등. 本草學. 서울: 영림사; 1991, 149-150, 498-499쪽.
31. 李時珍. 本草綱目. 중광대학출판사; 1995, 73-74쪽.
32. 이상인, 신민교, 노승현, 김선희, 이영중. 韓藥臨床應用. 서울: 성보사; 1991, 370, 589-590쪽.
33. 北京市衛生局. 中草藥製劑技術. 북경: 화학공업출판사; 1978, 318-322쪽.
34. 楊國藩. 本草備要解析. 중화민국: 國興出版社; 1973, 360쪽.
35. 辛民教. 임상본초학. 서울: 영림사; 1991, 614-615쪽.
36. 汪認庵. 醫方集解. 台北: 文光圖書有限公司; 中華62年, 227-231쪽.
37. 오승택. 간 부분절제한 흰쥐에서 superoxide dismutase가 과산화지질 및 간재생에 미치는 영향. 카톨릭대학교 의과대학 의과학교실 1994; 47(4) : 1581-1590.
38. 김경철, 이관식, 한광협, 최 원, 전재운, 이상인 등. 만성B형간질환에서의 지질 과산화. 대한간학회지 1997; 1 : 40-49.
39. Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepato-Gastroenterol* 1994; 41 : 343-348.
40. Paradis V, Kolinger M, Fabre M, Holstege A, Bedosa P. In situ detection of lipid peroxidation in chronic liver diseases. *Hepatology* 1996; 24 : 237A.
41. 박광숙. 각종 간질환에서의 과산화지질에 관한 연구. 대한내과학잡지 1984; 27(9) : 1051-1056.
42. Enterbauer H Schaur RJ Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11 : 81-128.
43. Pryor WA, Stanley TP and Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids (II). *Lipids* 1976; 11 : 370-379.
44. Krenitsky TA, Spector T. and Hall WW. Xanthine oxidase from human liver. Purification and characterization. *Arch Biochem. Biophys* 1986; 247 : 108-119.
45. Poulas TL and Raag R. Cytochrome P450 cam. Crystallography oxygen activation and electron transfer. *FASEB J* 1992; 6 : 674-679.
46. Ramzi SC, Vinay K and Stanley LR. Robbins pathologic basis of disease 4th ed. WB. Saunders Company; 1989, 9-12쪽.
47. McCord JM. Free radical and inflammation. Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974; 185 : 529-531.
48. Froh L, Gunzler WA and Schock HH. Glutathione peroxidase A selenoenzyme. *FEBS Lett* 1973; 32 : 132-134.
49. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand*; 1980, 492, 153쪽.
50. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzyme function for erythrocytes. *J Biol Chem* 1969; 244 : 6049.
51. Higashi T, Tateishi N and Sakamoto Y. Liver glutathione as a reservoir of L-cystein. In *Sulfur amino acids Biochemical and Clinical Aspects.* Alan R Liss press; 1983, 397-410쪽.