

四君子湯의 抗酸化 效果

이용태, 조수인*, 김영균**

동의대학교 한의과대학 생리학교실,

동신대학교 한의과대학 본초학교실*, 동의대학교 한의과대학 내과학교실**

Antioxidant Effects of *Sagunja-Tang* (*Sijunzi-Tang*)

Lee Yong-Tae, Cho Su-In*, Kim Young Kyun**

Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University,

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Dong-Shin University

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Abstract

Objectives : This study was carried out to research antioxidant effects of *Sagunja-Tang* (SA) through *in vitro* and *in vivo* experiments, and tried to investigate the relation between oxidation of tissues and deficiency of Qi. **Methods and results** : HPLC analysis of glycyrrhizine - known to be the main compound of *Radix Glycyrrhizae* - was done to certify the quality of SA. Chemiluminescence was initiated by adding tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) to rabbit polymorphonuclear leukocytes (neutrophils), and generated reactive oxygen species (superoxide anion) decreased significantly by SA as dose dependent manner. Cell injury during 60 minutes tissue incubation was initiated by adding t-BHP, a hydrophobic hydroperoxide and H₂O₂, an water soluble oxidant to rat renal cortical and liver slices. Percentage cell death and lipid peroxidation were estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) and malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. t-BHP induced % cell death of renal cortical slices and lipid peroxidation of renal cortical and liver slices were decreased significantly by SA. SA decreased significantly % cell death and lipid peroxidation of renal cortical and liver slices induced by H₂O₂, too. Acute renal and liver injury induced by HgCl₂ and CCl₄, which initiated from free radical, were applied to mice and metabolic data were obtained. Data showed protective effects of SA on acute renal injury caused by decrease of glomerular filtration. SA protected acute liver injury too. **Conclusions** : Through this study, we found that SA have antioxidant effects and tissue oxidation was similar to deficiency of Qi. And further studies have to be followed to certify the mechanisms.

Key words : antioxidant, oxygen species, cell death, lipid peroxidation

緒 論

四君子湯은宋代 陳¹⁾의 「太平惠民和劑局方」에 최초로記載된 처방으로 人蔘·白朮·茯苓 및 甘草로 구성되어 補氣健脾·利水消腫의 효능이 있으며 補氣의 기본 처방으로 사용되어지고 있다²⁾. 이 처방의適應症이 되는 氣虛는 큰 병을 앓거나 과로 등으로 元氣가 손상된 경우를 말하며 血虛에 사용하는 四物湯과 더불어 補益의 중요한 처방이다³⁾.

韓醫學의 古典인 「素問·上古天真論」에서는 “女子七歲腎氣盛 齒更髮長…七七任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭 地道不通 故形壞而無子也…丈夫八歲腎氣實 髮長齒更…八八則齒髮去”⁴⁾라 하였고, 「靈樞·天年」에서도 “人生十歲 五臟始定 血氣已通 其氣在下 故好走…百歲 五臟皆虛 神氣皆去 形骸獨居而終矣”⁵⁾라 하여 노화가 氣虛에 의해서도 유발됨을 기록하였다.

최근 활성 산소가 세포 구성 성분들을 비선택적이고 비가역적으로 파괴함으로써 암을 비롯하여 뇌졸중 등의 각종 질병을 일으키며 노화도 촉진하는 것으로 보고⁶⁾되고 있고, 항산화 물질이 뇌허혈 질환의 치료에 효과적이라는 연구⁷⁾도 발표되고 있다. 이에 따라 질병 치료 뿐만 아니라 노화 지연과 수명 연장을 목적으로 하는 활성 산소종 소거 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

이와 관련해 韓醫學界에서도 酸化의 損傷과 이의 치료에 대한 한의학적 연구의 결과로 여러 처방들이 酸化에 따른 손상에 효과가 있음을 보고하였으며, 四君子湯의 약효에 대해서도 여러 실험 연구들이 있었으나 항산화 효과에 대한 試驗管内 및 生體 實驗을 병행한 연구 결과는 아직 없었다.

그러므로 노화의 여러 원인 중 서양 의학에서의 활성 산소종 과잉 생성이 韓醫學에서의 氣虛와 관련이 있을 것으로 생각하여 氣虛의 기본 처방인 四君子湯의 抗酸化 效果를 검증하

였다. 먼저 시료의 표준화를 위하여 고성능 액체 크로마토그래피 (High performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 四君子湯 추출물에서 glycyrrhizine을 定量하였으며, 시험관내 실험에서 토끼 好中球에서 발생하는 superoxide의 생성을 chemiluminescence로 측정하였고, 흰 쥐의 腎皮質 및 肝組織 切片에서의 細胞 損傷과 脂質의 過酸化은 lactate dehydrogenase (LDH)의 流出과 脂質 過酸化의 산물인 malondialdehyde (MDA)의 함량으로 측정하였으며, 생체 실험에서는 생쥐의 급성 腎臟 및 肝臟의 組織 손상을 유발하고 이에 대한 四君子湯의 억제 효과를 확인하여 그 결과를 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

실험 동물은 6 주령 이상 체중 1.5~2.0 kg 되는 Newzealand White 종 토끼와 6 주령 체중 200 g 이상의 Sprague Dawley 계 수컷 흰 쥐 및 4 주령 이상 체중 30~40 g 되는 ICR 계 수컷 생쥐 (대한실험동물센터, Korea)를 고휘사료 (삼양 배합사료 실험동물용, 삼양 유지사료, Korea)와 물을 충분히 공급하면서 2 주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 藥材

人蔘·白朮·茯苓 및 甘草를 광명생약 (부산, Korea)에서 구입·정선하였고, 四君子湯의 구성 비율은 「太平惠民和劑局方」¹⁾에 따라 각 등분하였다 (Table 1).

Table 1. Prescription of *Sagunja-Tang*.

韓藥名	生藥名	重 量
人 蔘	<i>RADIX GINSENG</i> Panax ginseng C. A. MEYER	
白 朮	<i>RHIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE</i> Atractylodes macrocephala KOIDZ.	各 等分
茯 苓	<i>PORIA</i> Poria cocos (SCHW.) WOLF	
甘 草	<i>RADIX GLYCYRRHIZAE</i> Glycyrrhiza uralensis FISCH.	

3) 試藥

Glycyrrhizine, polyvinylpyrrolidone (pvp- 360), NaCl, KCl, Tris-HCl, CaCl₂, glycine, glutamate, glucose, phosphoric acid, thiobarbituric acid, luminol (3-Aminophthalhydrazide), histopaque 1077, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), tert-butyl hydroperoxide (t-BHP), DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM), HAM'S NUTRIENT MIX F-12, Hank's balanced salts (HBSS), corn oil, CCl₄, HgCl₂, 등은 Sigma社 (Sigma Chemical, U.S.A.) 제품을 사용하였고, 1-butanol은 Junsei (Junsei Chemical,

Japan) 제품을, HPLC grade methanol은 Fisher (Fisher Scientific, Korea) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 특급을 사용하였다.

2. 方法**1) 四君子湯 抽出物 중 glycyrrhizine의 定量을 위한 기기 및 분석 조건**

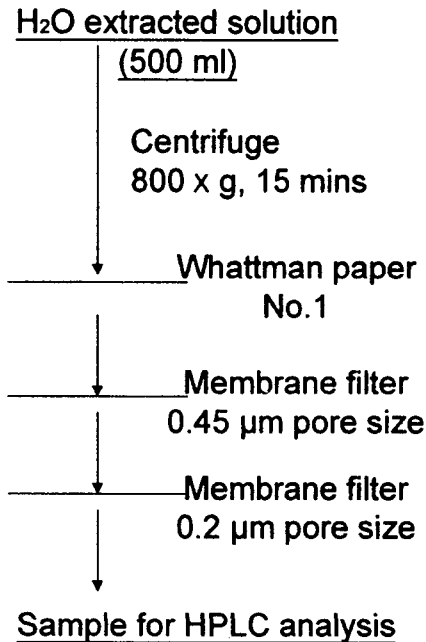
본 실험에서 사용한 HPLC System은 Waters 600 Controller (Waters co., U.S.A.)와 Waters 486 Tunable Absorbance detector (Waters co., U.S.A.)였으며, software는 영린 Aurochro-Win (영린기기, Korea)을 사용하였고 용매는 모두 HPLC 등급을 사용하였다. 분석 조건은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Analytical Condition for Measuring Natural Disposition in *Sagunja-Tang*.

Item	
Column	Waters μ BONDAPAK C ₁₈ (3.9×300 mm)
Column Temperature	Room Temperature
Mobile Phase	H ₂ O : Methanol = 2 : 1
Wave Length	254 nm
Injection Volume	10 μ l
Flow Rate	1.0 ml/min

2) HPLC 용 시료 전처리와 추출 조건

四君子湯 80 g에 증류수 1,000 ml을 가하여 가정용 약탕기 (DWP-99000T, 대웅, Korea)로 2 시간 煎湯한 뒤 여과하고 800×g에서 15 분간 원심분리한 후, Whattman paper No. 1로 여과한 후 다시 0.45 μm와 0.2 μm pore size membrane filter를 이용하여 차례로 여과하여 HPLC 용 시료로 사용하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of *Sagunja-Tang* Sample for HPLC Analysis.

3) 시험관내 및 생체 실험을 위한 시료 추출

四君子湯 80 g에 증류수 1,000 ml을 가하여 약탕기로 2 시간 정도 煎湯한 후 濾過한 藥液 약 500 ml를 건조기 (Vision, 비전과학, Korea)에서 건조하여 추출물을 얻었으며 최후의 乾燥物은 16.9 ± 0.23 g이었다. 시료를 사용하지 않을 때에는 냉동 보관해 두었다가 실험

직전에 필요한 농도로 희석하여 신선하게 사용하였다.

4) 好中球 분리

토끼의 後頭部를 强打하여 희생시킨 후 腹部 大動脈으로부터 채취한 혈액을 이용하여 polyvinylpyrrolidone 침전과 원심분리법을 사용하여 好中球를 분리하였다⁸⁾.

먼저 27 ml의 토끼 혈액에 3 ml의 5% EDTA/0.9% NaCl 용액을 섞은 후 다시 3 ml의 3% polyvinylpyrrolidone 용액을 가하여 서서히 섞고 40 분간 室溫에 방치한 뒤 상층액을 분리하였다. 이 상층액을 500×g에서 10 분 원심 침전하여 백혈구를 분리한 후 등장성 용액인 0.9% NaCl로 2 회 세척하여 부유시켰다. 침전물에 混在되어 있는 적혈구는 증류수를 가하여 저장성 용액인 0.18% NaCl 용액으로 만들어 溶血시키고 40 초 후 10% NaCl 용액을 가하여 등장성 용액이 되도록 하여, 500×g에서 10 분간 원심분리 하였다. 위의 조작은 混在한 적혈구가 완전히 溶血되도록 3 회 실시하였다. 침전된 백혈구를 0.9% NaCl로 부유시켜 1.5 배량의 histopaque 용액을 백혈구 부유액 아래에 重層 하고 1126×g에서 15 분간 원심분리하여 0.9% NaCl로 1 회 세척하였다. 분리된 好中球는 2ml의 DMEM/F12 medium에 부유시키고 측정에 사용하기 전까지 37℃로 보관하였으며 분리된 好中球의 수는 5×10^5 /ml 전후로 나타났다.

5) Superoxide 생성 측정

LB96P Microplate Luminometer (EG&G Berthold, Germany)의 chemiluminescence 측정용 cell을 A·B·C·D의 네 그룹으로 나누고 여기에 각각 HBSS 완충액 50 μl와 好中球의 DMEM/F12 부유액 50 μl와 22 mM luminol 10 μl를 넣고 20 분간 37℃에 방치하여 안정화시키면서 base line을 측정하였다. Base line이 안정된 이후 네 그룹 모두에 1 mM t-BHP를 주입하고 A 그룹에는 saline을, B·C·D 그

roup에는 四君子湯 추출물이 각각 0.1%, 0.5% 및 1% 용해된 saline을 20 μ l씩 注入하여 자극에 따라 발생된 superoxide에 의한 상승된 최고치를 base line과 비교하여 그 차이를 측정치로 하였다.

6) 腎皮質 및 肝組織 切片 제작

흰 쥐의 頸椎를 脫臼시켜 희생시킨 후 腎臟과 肝臟을 적출하여 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 된 냉장 보관 용액을 혈관 내로 주입하여 혈액을 제거하였다. 腎臟은 바깥의 단단한 皮膜을 제거하였다. 腎皮質과 肝組織을 Stadie-Riggs microtome (Tomas, U.S.A.)을 사용하여 가로 및 세로의 길이는 각각 1 cm, 두께는 약 0.3~0.5 mm 되도록 切片을 제작하였다.

7) 組織 배양

준비된 組織 切片을 4 ml의 배양액이 들어 있는 비커 속에 넣고 37°C water bath 내에서 100% 산소를 계속 공급하면서 배양하였다. 기본 배양액의 조성은 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 되어 있으며, 이들 약물이 들어 있는 용액 내에서 60 분 동안 배양하였다.

8) 細胞 死滅率 측정

腎皮質 및 肝組織 切片을 증류수와 함께 磨碎시켜 만든 조직액과 배양액을 각각 50 μ l 취하여 LDH 측정용 kit (아산제약 주식회사, Korea)을 이용하여 LDH 활성을 측정함으로써 細胞 死滅率을 계산⁶⁾하였는데 계산식은 다음과 같다.

$$\% \text{ Cell Death} = \frac{A}{(A+B)} \times 100$$

A : 배양 上騰液의 LDH 활성, B :

세포 내의 LDH 활성

9) 脂質 過酸化 측정

脂質의 過酸化는 腎皮質 및 肝組織 내 MDA 함량을 Uchiyama와 Mihara의 방법⁹⁾에 준하여 측정함으로써 평가하였다. 腎皮質과 肝組織 切片을 1% phosphoric acid 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 ml을 첨가하여 끓는 물에서 60 분간 증탕하였다. 1-butanol 4 ml을 첨가하여 완전히 섞은 다음 800×g에서 25 분간 원심분리 한 후, 상층액의 흡광도를 534 nm와 510 nm에서 측정하였다. MDA 값은 단백질 1 mg 당 pmoles로 표시하였으며, 단백질 농도는 Bradford의 방법¹⁰⁾으로 측정하였다.

10) HgCl₂에 의한 급성 腎組織 손상과 四君子湯 투여

생쥐를 5 마리 씩 정상군과 대조군 및 실험군으로 나누어 대조군과 실험군에 HgCl₂를 생리 식염수에 0.25% 농도로 녹여 5 mg/kg body weight 되도록 피하 주사 한 후 실험군에만 四君子湯 추출물 2 g/kg body weight/day로 7 일간 경구 투여하였다.

11) CCl₄에 의한 급성 肝組織 손상과 四君子湯 투여

생쥐 각 7 마리를 정상군과 대조군 및 실험군으로 나누어 대조군과 실험군에 CCl₄를 corn oil에 10% 농도로 희석하여 CCl₄가 1 ml/kg body weight 되도록 복강 주사한 후 실험군에는 四君子湯 추출물 2 g/kg body weight/day로 5 일간 경구 투여하였으며, 정상군에는 같은 비율로 복강에 corn oil을 주사하였다.

12) 혈청 분리와 腎臟 및 肝臟 적출

생쥐를 ether로 가볍게 마취시킨 후 頸椎 脫臼로 희생시켜 腹部 大靜脈으로부터 혈액을 채취하였으며, 이를 室溫에 30 분 이상 방치한 다음 800×g에서 25 분간 원심분리하여 얻은 혈청으로부터 creatinine · blood urea nitrogen (BUN) · alanine aminotransferase (AST) ·

aspartate aminotransferase (ALT) · total protein (TP) 및 glucose를 측정용 kit (아산제약 주식회사, Korea)을 이용하여 측정하였다. 혈액을 채취한 직후 腎臟과 肝臟을 적출한 다음 무게를 재어 체중에 대한 백분율을 계산하였으며, 腎皮質 및 肝組織을 떼내어 脂質의 過酸化 정도를 측정하였다.

13) 통계처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS (The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, U.S.A.)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준오차 (mean±S.E.)로 나타내었으며, 각 실험군간의 평균의 차이를 검정할 때에는 student's *t*-test로 검정하여 *p*-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

結 果

1. 四君子湯 抽出物 중 glycyrrhizine 定量

HPLC를 이용하여 glycyrrhizine 표준품과 대조하여 四君子湯 시료를 분석한 결과 머무름 시간 16.1에서 전체의 40.9%에 해당하는 glycyrrhizine이 검출되었다 (Table 3, Fig. 1). 四君子湯 抽出物에서의 glycyrrhizine 농도는 glycyrrhizine 표준품의 농도에 따른 검량선을 작성함으로써 계산하였다 (Table 3, Fig. 2). 즉 1×10^{-3} M과 3×10^{-3} M 농도의 glycyrrhizine을 각각 주입하였을 경우 128.4 mv×s 및 388.4 mv×s로 분석되어졌으므로 四君子湯 抽出物의 경우 228.9 mv×s이므로 여기서의 glycyrrhizine 농도는 1.77×10^{-3} M 이었다.

2. 시험관내 실험

1) 好中球의 superoxide 생성에 대한 四君子湯의 영향

t-BHP 처리에 의한 好中球에서의 superoxide 생성을 四君子湯이 어느 정도 억제할 수 있는지를 관찰하기 위하여 chemiluminometer를 이용하여 chemiluminescence를 측정된 결과 (Fig. 3), 1 mM t-BHP 20 μ l를 처리하였을 때 1214 ± 49 RLU/s 인데 비해 0.1%, 0.5%, 1% 四君子湯을 20 μ l 처리했을 때는 각각 864 ± 84 RLU/s ($p < 0.01$), 539 ± 83 RLU/s ($p < 0.001$), 276 ± 40 RLU/s ($p < 0.001$)로 유의하게 감소하였다 (Table 4, Fig. 4).

2) t-BHP에 의한 腎皮質 切片에서의 細胞 損傷 및 脂質 過酸化에 대한 영향

1 mM, 10 mM 및 100 mM t-BHP 처리한 후 60 분 동안 배양한 腎皮質 切片에서의 細胞 損傷과 脂質의 過酸化를 조사하였으며 이에 대한 四君子湯의 영향을 관찰하였다 (Fig. 5, 6).

아무런 처리를 하지 않고 배양한 정상군에서의 자연적인 細胞 死滅率은 $8.11 \pm 0.69\%$ 인데 비해 腎皮質 切片이 담긴 배양액에 1 mM 농도로 t-BHP를 처리한 대조군에서는 $41.87 \pm 4.04\%$ 로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 1% 四君子湯을 처리한 실험군에서는 細胞 死滅率이 $13.25 \pm 0.63\%$ 로 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였다. t-BHP의 농도를 10 mM, 100 mM로 높였을 경우에 대조군에서의 死滅率은 각각 $47.52 \pm 2.85\%$, $52.70 \pm 3.96\%$ 로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 1% 四君子湯을 처리한 경우에는 $19.04 \pm 3.27\%$ ($p < 0.001$), $25.48 \pm 3.33\%$ ($p < 0.01$)로 유의하게 細胞의 손상을 감소시켰다 (Fig. 5).

腎組織 切片에서의 脂質의 過酸化는 그 산물인 MDA 함량으로 나타내었는데, 아무런 처리를 하지 않고 배양시킨 정상군에서의 MDA 함량은 119.91 ± 8.72 pmole MDA/mg protein 이었으며, 1 mM, 10 mM 및 100 mM로 t-BHP를 각각 처리하였을 경우에는 611.77 ± 49.08 , 1325.62 ± 72.94 및 2139.24 ± 63.28 pmole MDA/mg protein으로 모두 유

의하게 ($p < 0.001$) 증가되었으며, 1% 四君子湯을 처리한 경우에는 215.51 ± 16.72 ($p < 0.001$), 1040.97 ± 25.40 ($p < 0.01$) 및 1449.37 ± 63.89 ($p < 0.001$) pmole MDA/mg protein으로 모두 유의하게 감소하였다 (Fig. 6).

3) t-BHP에 의한 肝組織 切片에서의 細胞 損傷 및 脂質 過酸化에 대한 영향

정상군에서의 자연적인 細胞 死滅率은 $17.81 \pm 1.99\%$ 인데 비해 肝組織 切片이 담긴 배양액에 1 mM, 10 mM 및 100 mM 농도로 t-BHP를 처리한 대조군에서는 $42.36 \pm 5.38\%$ ($p < 0.01$), $46.29 \pm 3.84\%$ ($p < 0.001$) 및 $49.47 \pm 4.46\%$ ($p < 0.001$)로 모두 유의하게 증가하였다. 여기에 1% 四君子湯을 처리한 실험군에서는 細胞 死滅率이 각각 $39.75 \pm 3.25\%$, $38.75 \pm 2.68\%$ 및 $40.32 \pm 4.09\%$ 로 모두 감소의 경향을 보였으나 유의하지는 않았다 (Fig. 7).

정상군에서의 MDA 함량은 206.96 ± 19.63 pmole MDA/mg protein이었으며, 1 mM, 10 mM 및 100 mM 농도로 t-BHP를 각각 처리하였을 경우에는 1345.10 ± 47.97 , 2519.10 ± 115.22 및 2468.63 ± 69.52 pmole MDA/mg protein으로 모두 유의하게 ($p < 0.001$) 증가되었다. 1% 四君子湯을 처리한 경우에는 208.62 ± 8.39 , 1728.44 ± 45.17 및 1818.11 ± 68.83 pmole MDA/mg protein으로 모두 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였다 (Fig. 8).

4) H₂O₂에 의한 腎皮質 切片에서의 細胞 損傷 및 脂質 過酸化에 대한 영향

M의 H₂O₂를 처리하였을 때 腎皮質 切片에서의 細胞 損傷과 脂質 過酸化를 조사하였다. 정상군에서의 細胞 死滅率은 $8.11 \pm 0.69\%$ 인데 비해 대조군에서는 $13.69 \pm 0.93\%$ 로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 1% 四君子湯을 처리한 실험군에서는 $7.83 \pm 0.92\%$ 로 유의하게 ($p < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 9).

脂質의 過酸化는 정상군의 경우 $119.91 \pm$

8.72 pmole MDA/mg protein인데 비해 대조군에서는 387.18 ± 17.12 pmole MDA/mg protein로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 1% 四君子湯을 처리하였을 경우에는 135.45 ± 10.60 pmole MDA/mg protein로 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였다 (Fig. 10).

5) H₂O₂에 의한 肝組織 切片에서의 細胞 損傷 및 脂質 過酸化에 대한 영향

정상군에서의 細胞 死滅率은 $17.81 \pm 1.99\%$ 인데 비해 50 mM의 H₂O₂를 처리하였을 때는 $32.61 \pm 1.10\%$ 로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 1% 四君子湯을 처리한 경우 $25.50 \pm 0.73\%$ 로 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였다 (Fig. 11).

MDA 함량은 정상군의 경우 206.96 ± 19.63 pmole MDA/mg protein이었으며 H₂O₂를 처리한 대조군의 경우 354.88 ± 24.70 pmole MDA/mg protein로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며 1% 四君子湯을 처리한 실험군에서는 182.68 ± 15.87 pmole MDA/mg protein으로 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였다 (Fig. 12).

3. 생체실험

1) HgCl₂에 의한 급성 腎組織 손상

(1) 급성 腎組織 손상에 의한 腎臟 및 肝臟의 무게 변화

아무런 처치를 하지 않은 정상군 생쥐의 경우 체중에 대한 腎臟의 무게를 백분율로 나타내었을 때 $2.36 \pm 0.09\%$ 였다. HgCl₂를 주입하여 급성 腎組織 손상을 유발시킨 대조군의 경우 $2.35 \pm 0.06\%$ 로 유의한 변화는 없었으며, 腎組織 손상을 유발한 생쥐에 四君子湯을 7 일간 투여한 실험군의 경우 $2.88 \pm 0.41\%$ 로 역시 유의한 변화는 나타나지 않았다 (Table 5).

肝臟의 무게는 정상군에서 $4.96 \pm 0.07\%$ 인데 비해 腎組織 손상이 유발된 대조군은

6.02±0.05%로 肝臟의 무게가 유의하게 (p<0.001) 증가하였으며, 실험군에서는 5.60±0.28%로 대조군에 비해 감소의 경향을 보였으나 유의하지는 않았다 (Table 5).

(2) 腎皮質 및 肝組織에서의 脂質 過酸化

腎皮質에서의 MDA 함량을 측정함으로써 脂質의 過酸化를 관찰하였는데, 정상군에서는 115.89±8.51, 대조군에서는 146.95±15.06 pmole MDA/mg protein로 유의한 변화는 없었으며, 실험군에서도 100.09±14.84 pmole MDA/mg protein으로 역시 유의한 변화는 나타나지 않았다 (Table 5).

정상군 생쥐 肝組織에서의 MDA 함량은 114.17±32.89 pmole MDA/mg protein이었으며 대조군에서는 147.98±21.03 pmole MDA/mg protein로 유의한 변화는 없었으며, 실험군에서도 132.85±20.73 pmole MDA/mg protein로 유의한 변화는 없었다 (Table 5).

(3) 혈청 중 creatinine · BUN · TP 및 glucose 함량 변화

정상군 생쥐의 혈청 중 creatinine 함량은 0.57±0.03 mg/dl인데 비해 대조군에서는 0.87±0.07 mg/dl로 유의하게 (p<0.01) 증가하여 腎機能의 손상이 있었음을 보였으며, 실험군에서는 0.58±0.03 mg/dl로 유의하게 (p<0.01) 감소하여 四君子湯이 腎機能의 손상을 방지하는 효과가 있음을 보였다 (Table 5).

정상군에서의 혈청 중 BUN 함량은 23.89±1.48 mg/dl였으며 대조군에서는 33.83±3.51 mg/dl로 유의하게 (p<0.05) 증가하였으며, 실험군에서는 36.90±5.91 mg/dl로 유의한 변화가 나타나지 않았다 (Table 5).

정상군에서의 혈청 중 TP의 함량은 3.95±0.11 g/dl였으며 대조군에서는 4.17±0.11 g/dl로 유의한 변화는 없었으며, 실험군에서도 4.30±0.42 g/dl로 유의한 변화는 나타나지 않았다 (Table 5).

정상군에서의 혈청 중 glucose 함량은 130.00±11.27 mg/dl였으며 대조군에서는 81.91±11.69 mg/dl로 유의하게 (p<0.05) 감소하였다. 하지만 실험군에서는 72.96±3.18 mg/dl로 유의한 변화가 나타나지 않았다 (Table 5).

(4) 혈청 중 AST 및 ALT 함량 변화

혈청 중 AST 함량은 정상군에서 51.40±5.07 Karmen/ml였으며 대조군에서는 65.00±2.95 Karmen/ml로 유의하게 (p<0.05) 증가하였으며, 실험군에서는 74.00±5.40 Karmen/ml로 대조군에 비해 유의한 변화는 없었다 (Table 5).

혈청 중 ALT 함량은 정상군에서 12.80±1.16 Karmen/ml, 대조군에서 13.60±0.68 Karmen/ml, 실험군에서 12.00±1.52 Karmen/ml로 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (Table 5).

2) CCl₄에 의한 급성 肝組織 손상

(1) 급성 肝組織 손상에 의한 肝臟 및 腎臟 무게의 變化

아무런 처리를 하지 않은 정상군 생쥐의 경우 체중에 대한 肝臟의 무게는 5.31±0.08%였으며 肝組織 손상을 유발시킨 대조군의 경우 6.40±0.33%로 肝臟 무게의 변화에 유의한 (p<0.05) 증가를 보였다. 肝組織 손상을 유발시킨 후 四君子湯을 5일간 투여한 실험군에서의 肝臟의 무게는 6.78±0.27%로 유의한 변화가 나타나지 않았다 (Table 6).

腎臟 무게의 변화에서 정상군에서는 1.95±0.05%였으며 대조군은 2.49±0.27%, 실험군에서는 1.89±0.05%로 각 실험군 사이에 유의한 차이가 없었다 (Table 6).

(2) 肝組織 및 腎皮質에서의 脂質 過酸化

정상군 肝組織에서의 MDA 함량은 135.07±6.22 pmole MDA/mg protein이었으며, 대

조군에서는 162.62 ± 9.74 pmole MDA/mg protein로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였다. 실험군에서는 146.40 ± 7.38 pmole MDA/mg protein로 유의한 변화가 나타나지 않았다 (Table 6).

腎皮質 組織에서 정상군·대조군 및 실험군 腎皮質에서의 MDA 함량은 각각 138.42 ± 4.98 , 139.19 ± 10.91 및 125.83 ± 7.65 pmole MDA/mg protein으로 유의한 변화가 없었다 (Table 6).

(3) 혈청 중 AST 및 ALT 함량 변화

혈청 중 AST 함량은 정상군에서 55.71 ± 5.16 Karmen/ml인데 비해 대조군에서는 94.94 ± 5.02 Karmen/ml으로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였다. 하지만 실험군에서는 84.43 ± 3.57 Karmen/ml으로 유의한 변화는 없었다 (Table 6).

혈청 중 ALT 함량은 정상군에서 18.14 ± 2.16 Karmen/ml인데 비해 대조군에서는 30.14 ± 1.35 Karmen/ml으로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 실험군에서는 21.29 ± 1.87 Karmen/ml으로 유의하게 ($p < 0.01$) 감소하였다 (Table 6).

(4) 혈청 중 creatinine · BUN · TP 및 glucose 함량 변화

혈청 중 creatinine 함량은 정상군에서 0.59 ± 0.03 mg/dl인데 비해 대조군에서는 1.18 ± 0.10 mg/dl으로 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 四君子湯을 투여한 실험군에서는 0.78 ± 0.02 mg/dl로 유의하게 ($p < 0.01$) 감소하였다 (Table 6).

혈청 중 BUN 함량은 정상군에서 23.41 ± 0.87 mg/dl인데 비해 대조군에서는 56.38 ± 9.89 mg/dl로 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였으며, 실험군에서는 26.24 ± 3.57 mg/dl로 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다 (Table 6).

혈청 중 TP 함량은 정상군에서 4.10 ± 0.09 g/dl인데 비해 대조군에서 5.44 ± 0.20 g/dl로

유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, 실험군에서는 5.07 ± 0.16 g/dl로 유의한 변화가 나타나지 않았다 (Table 6).

혈청 중 glucose 함량은 정상군·대조군 및 실험군에서 각각 140.54 ± 7.02 , 134.23 ± 16.39 및 118.95 ± 6.74 mg/dl로 유의한 변화가 없었다 (Table 6).

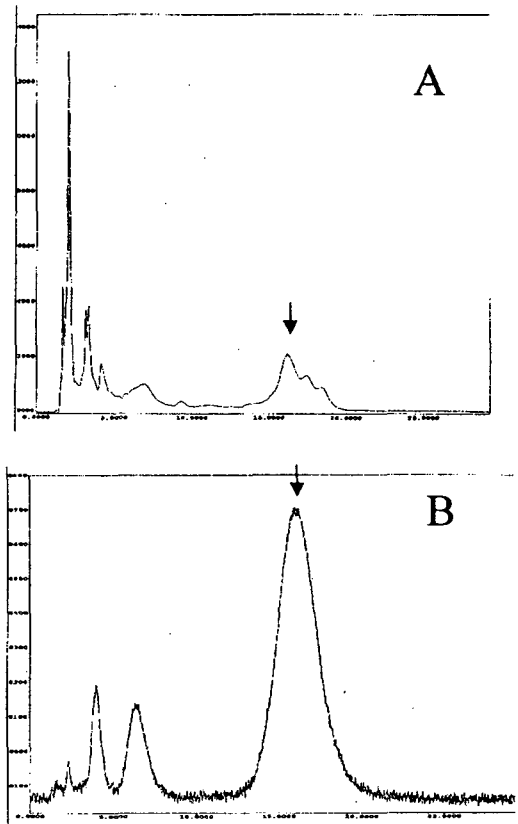


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Glycyrrhizine (\downarrow) in SA (A) and Authentic Glycyrrhizine(B).

Table 3. Amount of Glycyrrhizine in SA and Authentic Glycyrrhizine.

	Retention Time	Amount (mv × s)	Amount %
<i>Sagunja-Tang</i>	16.1	228.9	40.9
Glycyrrhizine	1×10^{-3} M	128.4	84.0
	3×10^{-3} M	388.4	71.3

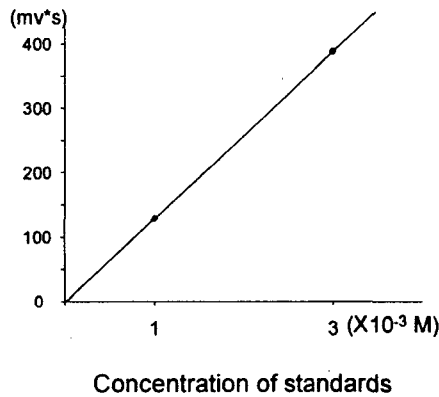


Fig. 2. Standard Calibration Curve of Authentic Glycyrrhizine (Injection Volume, 10 μ l).

Table 3. Chemiluminescence Generation in 1 mM t-BHP Stimulated Rabbit Neutrophils. (RLU/s)

Treatment	Concentrations of SA (%)			
	0 (control)	0.1	0.5	1
SA	1214 ± 49	864 ± 84 **	539 ± 83 ***	276 ± 40 ***

Chemiluminescence was initiated by adding t-BHP to rabbit neutrophils, and 20 μ l of saline or saline with SA was added immediately after addition of t-BHP.

Values are mean ± SE of 8~10 experiments.

SA : *Sagunja-Tang*.

*, Significantly different from the control (**, p<0.01 ; ***, p<0.001).

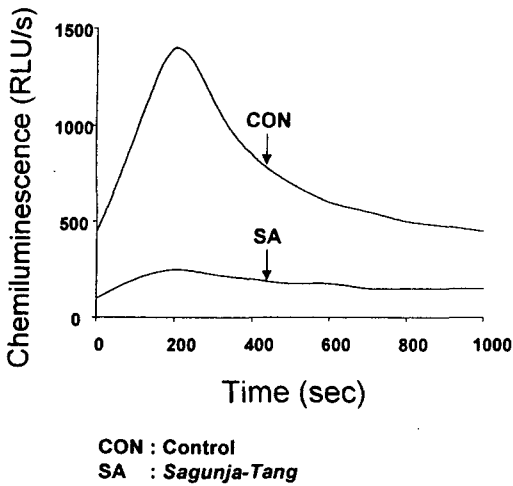


Fig. 3. Exhibition of Chemiluminescence.

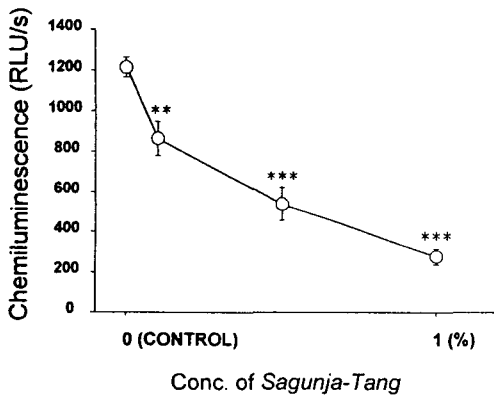


Fig. 4. Inhibition of Chemiluminescence by Sagunja-Tang (SA) in t-BHP Stimulated Rabbit Neutrophils.

Chemiluminescence was initiated by adding 1 mM t-BHP to rabbit neutrophils, and saline or saline with SA was added immediately after addition of t-BHP.

Values are mean \pm S.E. of 8~10 experiments.
 *, Significantly different from the control (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

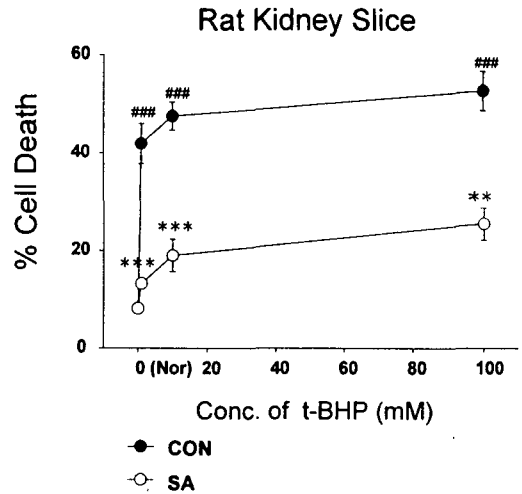


Fig. 5. Effect of SA on t-BHP Induced % Cell Death in Rat Renal Cortical Slices.

Slices were treated with 1, 10 and 100 mM t-BHP in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and LDH release was measured.

Values are mean \pm S.E. of six experiments.
 #, Significantly different from the normal (###, $p < 0.001$).
 *, Significantly different from the control (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

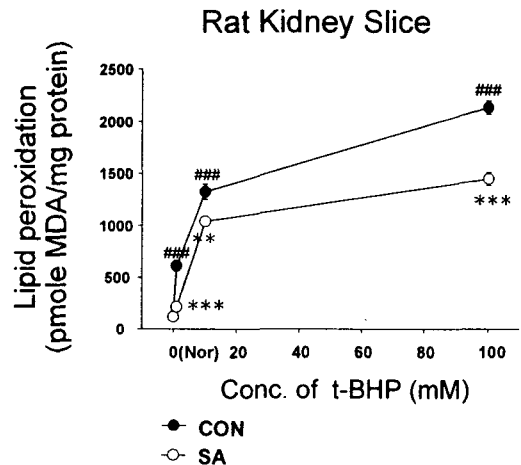


Fig. 6. Effect of SA on t-BHP Induced Lipid Peroxidation in Rat Renal Cortical Slices.

Slices were treated with 1, 10 and 100 mM t-BHP in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and lipid peroxidation was measured.

Values are mean ± S.E. of six experiments.

#, Significantly different from the normal (###, $p < 0.001$).

*, Significantly different from the control (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

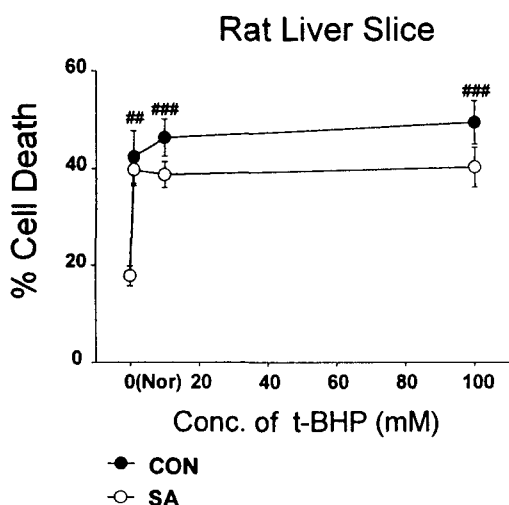


Fig. 7. Effect of SA on t-BHP Induced % Cell Death in Rat Liver Slices.

Slices were treated with 1, 10 and 100 mM t-BHP in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and LDH release was measured.

Values are mean ± S.E. of six experiments.

#, Significantly different from the normal (##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$).

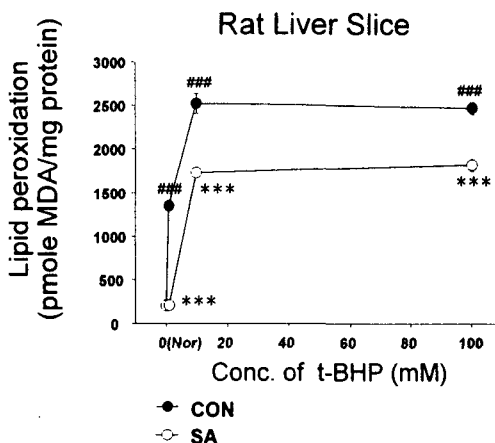


Fig. 8. Effect of SA on t-BHP Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Slices.

Slices were treated with 1, 10 100 and mM t-BHP in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and lipid peroxidation was measured.

Values are mean ± S.E. of six experiments.

#, Significantly different from the normal (###, $p < 0.001$).

*, Significantly different from the control (***, $p < 0.001$).

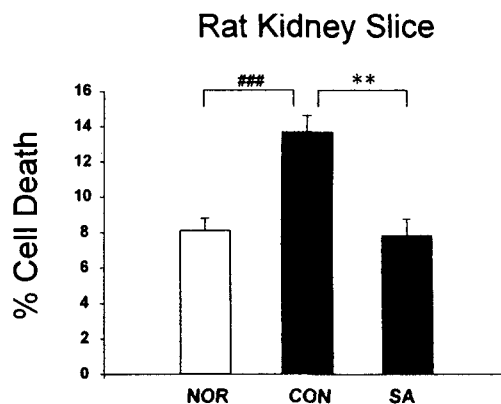


Fig. 9. Effect of SA on H₂O₂ Induced % Cell Death in Rat Renal Cortical Slices.

Slices were treated with 50 mM H₂O₂ in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and LDH release was measured.

Values are mean ± S.E. of six experiments.

#, Significantly different from the normal (###, p<0.001).

*, Significantly different from the control (**, p<0.01).

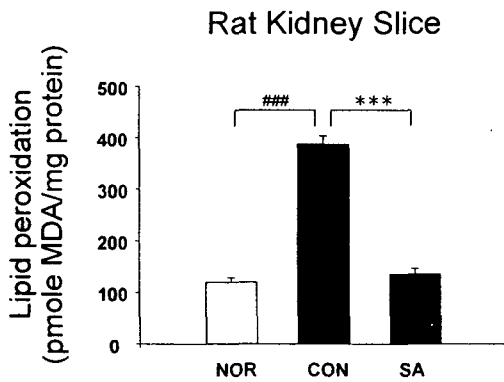


Fig. 10. Effect of SA on H₂O₂ Induced Lipid Peroxidation in Rat Renal Cortical Slices.

Slices were treated with 50 mM H₂O₂ in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and lipid peroxidation was measured.

Values are mean ± S.E. of six experiments.

#, Significantly different from the normal (###, p<0.001).

*, Significantly different from the control (***, p<0.001).

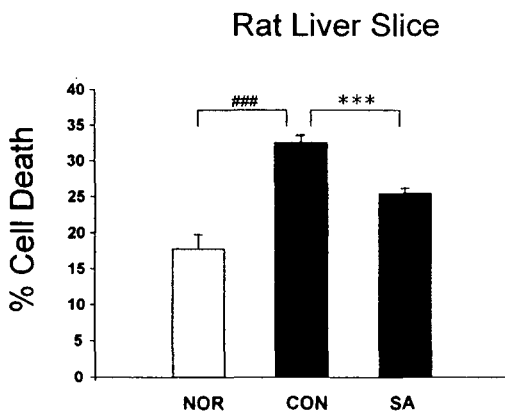


Fig. 11. Effect of SA on H₂O₂ Induced % Cell Death in Rat Liver Slices.

Slices were treated with 50 mM H₂O₂ in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and LDH release was measured.

Values are mean ± S.E. of six experiments.

#, Significantly different from the normal (###, p<0.001).

*, Significantly different from the control (***, p<0.001).

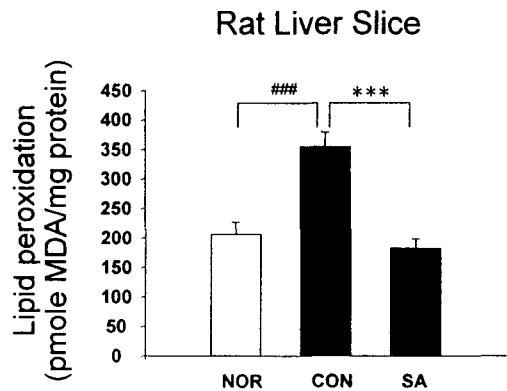


Fig. 12. Effect of SA on H₂O₂ Induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Slices.

Slices were treated with 50 mM H₂O₂ in the absence or presence of SA for 60 mins at 37°C, and lipid peroxidation was measured.

Values are mean ± S.E. of six experiments.

#, Significantly different from the normal (###, p<0.001).

*, Significantly different from the control (***, p<0.001).

Table 5. Metabolic Data from Acute Renal Injury Induced by HgCl₂.

Group		Normal	Control	Sample
weight/body weight ×100 (%)	Kidney	2.36±0.09	2.35±0.06	2.88±0.41
	Liver	4.96±0.07	6.02±0.05 ###	5.60±0.28
MDA (pmole MDA/ mg protein)	Kidney	115.89±8.51	146.95±15.06	100.09±14.84
	Liver	114.17±32.89	147.98±21.03	132.85±20.73
Serum Level of	Creatinine (mg/dl)	0.57±0.03	0.87±0.07 ##	0.58±0.03 **
	BUN (mg/dl)	23.89±1.48	33.83±3.51 #	36.90±5.91
	Total Protein (g/dl)	3.95±0.11	4.17±0.11	4.30±0.42
	Glucose (mg/dl)	130.00±11.27	81.91±11.69 #	72.96±3.18
	AST (Karmen/ml)	51.40±5.07	65.00±2.95 #	74.00±5.40
	ALT (Karmen/ml)	12.80±1.16	13.60±0.68	12.00±1.52

Note. Mercuric chloride was administered subcutaneously (5 mg/kg body weight).

All values are mean±S.E. of five animals.

#, Significantly different from the mean for corresponding group of normal mice.
(#, p<0.05 ; ##, p<0.01 ; ###, p<0.001)

*, Significantly different from the mean for corresponding group of control mice.
(**, p<0.01)

Table 6. Metabolic Data from Acute Hepatic Injury Induced by CCl₄.

Group		Normal	Control	Sample
weight/body weight ×100 (%)	Liver	5.31±0.08	6.40±0.33 #	6.78±0.27
	Kidney	1.95±0.05	2.49±0.27	1.89±0.05
MDA (pmole MDA/ mg protein)	Liver	135.07±6.22	162.62±9.74 ###	146.40±7.38
	Kidney	138.42±4.98	139.19±10.91	125.83±7.65
Serum Level of	AST (Karmen/ml)	55.71±5.16	94.94±5.02 ###	84.43±3.57
	ALT (Karmen/ml)	18.14±2.16	30.14±1.35 ###	21.29±1.87 **
	Creatinine (mg/dl)	0.59±0.03	1.18±0.10 ###	0.78±0.02 **
	BUN (mg/dl)	23.41±0.87	56.38±9.89 #	26.24±3.57 *
	Total Protein (g/dl)	4.10±0.09	5.44±0.20 ###	5.07±0.16
	Glucose (mg/dl)	140.54±7.02	134.23±16.39	118.95±6.74

Note. Carbon tetrachloride was administered intraperitoneally (1 ml/kg body weight).

All values are mean±S.E. of seven animals.

#, Significantly different from the mean for corresponding group of normal mice.
(#, p<0.05 ; ###, p<0.001)

*, Significantly different from the mean for corresponding group of control mice.
(*, p<0.05 ; **, p<0.01)

考 察

인체의 생리적인 변화 과정에 대해 「素問·上古天真論」에서 “女子七歲腎氣盛 齒更髮長 二七而天癸至 任脈通 太衝脈盛 月事以時下 故有子 三七腎氣平均 故真牙生而長極 四七筋骨堅 髮長極 身體盛壯 五七陽明脈衰 面始焦 髮始墮 六七三陽脈衰於上 面皆焦 髮始白 七七任脈虛 七七任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭 地道不通 故形壞而無子也…丈夫八歲腎氣實 髮長齒更 二八腎氣盛 天癸至 精氣溢瀉 陰陽和 故能有子 三八腎氣平均 筋骨勁強 故真牙生而長極 四八筋骨隆盛 肌肉滿壯 五八腎氣衰 髮墮齒槁 六八陽氣衰竭於上 面焦 髮鬢頰白 七八肝氣衰 筋不能動 天癸竭 精少 腎臟衰 形體皆極 八八則齒髮去”⁴⁾라 하여 사람이 태어나서 여자는 35 세가 되면 비로소 陽明脈이 쇠하여지면서 노화가 시작되며 男子는 40 세에 腎氣가 쇠해지면서 생리 기능의 쇠퇴가 시작된다고 설명하였다. 「素問·陰陽應象大論」에서도 “陽生陰長 陽殺陰藏 陽化氣 陰成形”⁴⁾이라 하여 陽氣가 인체에서 중요한 작용을 하며 陽이 氣로 化한다고 설명하여 氣와 陽이 한 가지임을 설명하였고, 「素問·天元紀大論」에서도 “故在天爲氣 在地成形 形氣相感 而化生萬物矣”⁴⁾라 하여 氣가 세상을 구성하는 기초 물질이며 이로부터 만물이 생겨난다고 설명하는 등 한의학적인 관점에서 사람도 세상의 구성 물질 중 하나이기 때문에 氣로 인해 생겨났으며 또한 氣의 盛衰에 의해 生死가 결정된다고 하였다. 「靈樞·天年」에서도 “人生十歲 五臟始定 血氣已通 其氣在下 故好走 二十歲 血氣始盛 肌肉方長 故好趨 三十歲 五臟大定 肌肉堅固 血氣盛滿 故好步 四十歲 五臟六腑十二經脈 皆大盛以平定 腠理始疎 榮華漸落 髮斑白 平減不搖 故好坐 五十歲 肝氣始衰 肝葉始薄 膽汁始減 目始不明 六十歲 心氣始衰 苦憂悲 血氣懈惰 故好臥 七十歲 脾氣虛 皮膚枯 八十歲 肺氣衰 魄離 故言善誤 九十歲 腎氣焦 四臟經脈空虛 百歲

五臟皆虛 神氣皆去 形骸獨居而終矣”⁵⁾라 하여 氣의 盛衰에 따른 생리적인 인체의 변화 과정을 설명하였으며, 또한 “其五臟皆不堅 使道不長 空外以張 喘息暴疾 又卑基牆薄 脈少血 其肉不實 數中風寒 血氣虛 脈不痛 眞邪相攻 亂而相引 故中壽而盡也”⁵⁾라 하여 병리적인 변화에 대해서도 설명하였다. 그러므로 이상의 내용으로 한 의학적인 관점에서 질병의 발생과 노화의 원인에 氣虛도 포함됨을 알 수 있다.

氣虛의 현대적인 의미는 全身의 인 기능저하에 따른 일련의 증후로 중추의 흥분성 저하·물질대사 특히 同化作用의 減弱·면역능의 저하·저단백혈증·빈혈상태 등과 관련이 있다²⁾. 氣虛의 한의학적 원인은 先天的으로 부족하게 태어났거나, 後天的으로 영양을 실조하였거나, 臟腑의 기능이 失調되어 氣의 생산에 영향을 주었거나, 과로하여 氣를 많이 손상하였거나, 房勞가 과하여 腎精을 손상하였거나, 심한 병이나 오랜 병 혹은 汗·吐·下가 지나치거나 혹은 피를 많이 흘리는 등으로 氣를 과다하게 소모한 경우로 나눌 수 있다⁴⁾. 그리고 氣를 여러 종류로 나누어 元氣와 衛氣 등으로 표현하기도 하는데, 元氣가 허할 경우 생장 발육이 지연되고 생식 능력이 저하될 뿐 아니라 모든 생리 활동이 감퇴되며, 衛氣가 허할 경우 환자는 추워하고 땀을 잘 흘리며 외부의 邪氣에 자주 침범 당하게 된다⁴⁾. 그러므로 인체 각 臟腑의 기능에 이상이 생겨 질병이 발생한다거나 이로 인해 노화가 비정상적으로 빨리 진행되는 과정이 氣虛와 연관되어 있음을 알 수 있다.

이러한 氣虛의 상태에서는 補益中氣의 治法을 이용하고 일반적으로 四君子湯 加減方이 많이 응용되고 있는데 人蔘·白朮·茯苓 및 甘草가 이의 구성 약물이 된다³⁾. 人蔘은 補氣藥類로 분류되어 大補元氣·補脾益氣·生津止渴·寧神益智 등의 효능이 있으며, 白朮은 補氣藥類로 분류되어 補脾益氣·燥濕利水·固表止汗·安胎의 효능이 있으며, 茯苓은 利水藥類로 분류

되어 利水滲濕·健脾補中·寧心安神의 효능이 있으며, 甘草는 補氣藥類로 분류되어 補脾益氣·潤肺止咳·緩急止痛·清熱解毒의 효능이 있다¹¹⁾. 위의 약물들로 구성된 四君子湯은 「太平惠民和劑局方」¹⁾에 최초로記載된 처방으로, 榮衛氣虛·臟腑怯弱·心腹脹滿·全不思食·腸鳴泄瀉·嘔噦吐逆을 치료한다고 기록되어 있으며, 현대적인 분류로는 補氣劑에 속하여 補氣健脾·利水消腫의 효능이 있고 脾胃氣虛가 적응증이 된다. 또 補氣의 기본 처방으로서 補氣劑의 대부분은 本方을 加減하여 만들어지며 補氣의 효능이 있는 人蔘이 主藥이 되고 補氣健脾·利水の 효능을 가진 白朮과 健脾利水の 효능을 가진 茯苓이 이를 도우며 補氣의 효능과 諸藥을 調和하는 효능을 가진 甘草가 배합되어 있어 모든 약물이 寒熱에 치우치지 않는 平性이라 해서 平補의 方劑라고도 한다²⁾. 이러한 효능으로 인해 四君子湯은 현대에 와서는 抗胃潰瘍의 작용을 하며 면역 기능을 높일 뿐 아니라 抗腫瘍과 抗突然變異 등의 효능이 있음이 밝혀지고 있다¹²⁾.

과학과 의학의 발달로 인해 인간 수명이 연장되는 등 많은 업적들이 있었으나 이에 못지 않게 암·고혈압·당뇨·AIDS 등의 난치성 질환이 증가하는 추세에 있으며 이러한 질병들이 거의가 복합적이거나 다양한 원인에 의해서 발생되기 때문에 치료에 대한 이렇다할 해답을 얻지 못하고 있다. 이러한 가운데 抗酸化 물질이 뇌허혈 질환의 치료에 효과적이라는 연구⁷⁾ 등을 비롯하여 활성 산소가 세포 구성 성분들에 대해 비선택적·비가역적인 파괴 작용을 함으로써 암을 비롯하여 뇌졸중 등의 각종 질병 및 노화를 일으키는 것으로 보고되고 있으며⁶⁾, 그 외에 많은 연구를 통해 여러 퇴행성 질환에서 반응성 산소기들이 이러한 질환을 유발하는 생물학적인 원인으로만이 아니라 정상적인 노화의 과정에도 함께 관여하는 것으로 인정되고 있다¹³⁻¹⁶⁾.

이와 관련해 韓醫學界에서도 酸化的 손상과 이의 치료에 대한 연구들이 많이 보고되어 酸化的 損傷과 이의 치료에 대해 여러 처방들이 효과가 있는 것으로 알려졌으며, 四君子湯에 관해 본 연구와 유사한 여러 실험들이 진행된 바 있으나 四君子湯의 抗酸化 효과에 대한 주요 구성 물질의 분석·시험관내·생체 실험을 병행한 연구 결과는 아직 보고된 바 없었다.

이에 본 연구에서는 우선 四君子湯 추출액을 HPLC system을 이용하여 분석하여 보았다 (Scheme 1). 그 결과 머무름 시간 16.1에서 四君子湯 추출물의 40.9%에 해당하는 물질이 검출되었으며, 본 연구에는 나타내지 않았지만 우선 추출 성분 중 많은 양을 차지하는 물질을 검색하기 위해 개개의 구성 약재의 추출액을 얇은 막 크로마토그래피와 HPLC를 이용해 분석함으로써 이 물질이 甘草의 주요 성분으로 알려진 glycyrrhizine임을 확인하였다.

시료로 사용된 四君子湯 추출물에서의 glycyrrhizine 추출량을 확인하기 위해 glycyrrhizine 표준 물질을 이용하여 검량선을 작성하였으며 四君子湯 추출물에서의 추출량과 비교하여 보았다 (Table 3, Fig. 1, 2). 그 결과 주입된 四君子湯 추출물 10 μ l 중 머무름 시간 16.1에서 1.77×10^{-3} M의 glycyrrhizine이 검출되었음을 알 수 있다. 따라서 四君子湯의 표준화를 위해서는 甘草의 주요 구성 성분인 glycyrrhizine을 이용하는 것이 편리할 것으로 생각된다.

토끼를 이용한 시험관내 실험을 위해 酸化劑에 의한 세포 손상 연구에 많이 이용되고 있는 약물 모델¹⁷⁾인 t-BHP를 이용하여 토끼 혈액 중의 好中球를 자극해 보았다.

好中球는 여러 가지 刺戟劑들에 의하여 자극 받았을 때나 飮食 작용 동안에 superoxide (O_2^-)와 H_2O_2 등의 활성 산소종들의 생산이 증가되는데, 이러한 현상을 respiratory burst라 하며 飮食 細胞들의 방어 작용의 주요 기전으로 생각되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 이러한 과정 중에

superoxide가 전구물질이 되어 이차적으로 이차적으로 살균 작용을 하는 OH^\cdot 와 HOCl 과 같은 독성이 강한 활성 산소종들이 생산된다.²¹⁾ 하지만 superoxide가 세포 내외 조직에서 생성될 때 독성을 일으키므로 직접적으로든 간접적으로든 질병을 일으키는 원인이 된다²²⁾. Superoxide는 또한 과립 白血球나 大食 細胞의 활성화 등으로부터 발생하고 있다²²⁾. 또한 이로써 생겨난 활성 산소종들에 의해 세포 구성 성분들인 脂質·단백질·당·DNA 등이 비선택적·비가역적으로 파괴됨으로써 암을 비롯하여 뇌졸중·파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환·허혈·동맥경화·피부질환·소화기질환·염증·류마티스·자가면역질환 등의 각종 질병과 노화를 일으킬 수 있으므로⁶⁾ 활성 산소종을 소거하거나 過酸化 物 생성을 억제하는 물질들은 이들 酸化 物들에 의하여 야기되는 각종 질환 치료제 및 노화 억제제로 기대된다.

四君子湯의 好中球에서의 superoxide 생성 억제 효과를 살피기 위해 chemiluminescence를 측정된 결과, 1 mM 농도의 t-BHP 20 μl 를 처리하고 四君子湯을 0.1, 0.5 및 1% 농도로 20 μl 씩 주입했을 때 chemiluminescence가 유의하게 감소하였으므로, 四君子湯이 t-BHP 자극으로 인한 활성 산소종의 생성을 농도 의존적으로 억제하였음을 알 수 있다 (Table 4, Fig. 3, 4).

세포는 면역 또는 염증반응에 관여하는 여러 세포나 화학적 인자 등과 접촉함으로써 여러 형태의 손상을 받게 되는데²³⁾ 부분적으로 환원된 활성화된 산소기는 세포사를 일으키는 중요한 매개체로 작용하며, 이러한 프리 라디칼은 세포 내에서 脂質 過酸化의 원인이 되어 세포에 다른 유해한 영향을 미치게 된다^{23, 24)}. 따라서 酸化劑들이 세포 손상을 일으키는 기전 중의 하나는 脂質의 過酸化이므로²⁵⁾ 일반적으로 脂質의 過酸化 정도를 측정하여 細胞 손상이 酸化劑로 인해 유발되었는지를 확인하고 있는데, 생체 세포막들은 불포화지방산을 많이 함

유하고 있기 때문에 프리 라디칼들의 공격을 쉽게 받아 脂質의 過酸化가 발생되게 되고²⁶⁾, 細胞膜 脂質의 過酸化는 세포막의 투과성을 변화시키고 물질 移動系에 관여하는 단백질들의 기능을 저해하기 때문에 細胞 기능 손상의 중요한 원인으로 인정되고 있다^{17, 26~29)}. 이러한 脂質의 過酸化 산물인 MDA는 불포화지방산이 직접적 또는 간접적으로 過酸化 과정을 통해 분해됨으로써 생성되는데, 脂質이 過酸化되면 결과적으로 細胞 손상을 일으키며 세포막에 결합된 효소의 활성도를 떨어뜨리는 등 세포막의 생리 화학적인 성질을 변화시키는 요인이 된다^{22, 25)}. 따라서 酸化劑에 의한 細胞 독성을 방지하는 약물들은 脂質의 過酸化를 감소시키는 효과를 가지고 있을 것이므로 細胞死와 脂質의 過酸化를 측정하는데 각각 사용되는 % LDH 즉 細胞 死減率과 MDA 생성 정도를 측정하여 1% 농도의 四君子湯이 疏水性 酸化劑인 t-BHP 및 水溶性 酸化劑인 H_2O_2 ³⁰⁾ 처리로 인한 細胞의 손상과 脂質의 過酸化를 어느 정도 억제하는지를 살펴보았다.

t-BHP를 농도별로 처리한 후 60 분 동안 배양시킴으로써 腎皮質 切片에서의 細胞 손상과 脂質의 過酸化를 유발하고 이에 대한 四君子湯의 영향을 관찰한 결과, 腎皮質 切片에 1 mM, 10 mM 및 100 mM 농도로 t-BHP를 처리하였을 때 細胞 死減率이 모두 유의하게 증가하였으며, 1% 四君子湯을 처리한 실험군에서는 유의하게 細胞 死減率을 감소시켰다. 그러므로 四君子湯이 腎皮質 切片에서의 細胞의 손상을 억제하였음을 알 수 있다 (Fig. 3). 脂質의 過酸化 역시 정상군에 비해 대조군에서 모두 유의하게 증가되었으며, 四君子湯을 함께 처리한 경우 모두 유의하게 감소하였다. 그러므로 腎皮質 切片에서 여러 농도의 t-BHP에 의한 細胞의 損傷과 脂質의 過酸化는 1% 농도 四君子湯에 의해 유의하게 억제되었음을 알 수 있다 (Fig. 4).

肝組織 切片에서도 t-BHP에 의한 細胞 손상

및 脂質 過酸化에 대한 영향을 조사하였는데, 정상군에 비해 1 mM, 10 mM 및 100 mM 농도로 t-BHP를 처리한 대조군에서 細胞의 死滅率이 모두 유의하게 증가하였다. 여기에 四君子湯을 함께 처리한 실험군에서는 細胞 死滅率이 감소의 경향을 보였으나 유의하지는 않았다 (Fig. 5). 脂質 過酸化의 산물인 MDA 함량은 정상군에 비해 대조군에서 모두 유의하게 증가하였으며, 1% 四君子湯을 처리한 경우에는 MDA 함량이 모두 유의하게 감소하였다. 그러므로 肝組織 切片에서는 t-BHP에 의한 細胞의 손상은 防止하지 못하였지만 脂質의 過酸化는 1% 농도 四君子湯에 의해 억제되었음을 알 수 있다 (Fig. 6).

50 mM의 H₂O₂를 腎皮質 切片에 처리하였을 때 細胞 死滅率은 四君子湯에 의해 유의하게 감소하였으며, MDA 함량 역시 四君子湯을 처리하였을 경우 유의하게 감소하였으므로 t-BHP를 처리하였을 경우와 마찬가지로 細胞의 손상과 脂質의 過酸化 역시 四君子湯에 의해 감소하였음을 보이고 있다 (Fig. 7, 8). 肝組織 切片에서의 細胞 死滅率은 腎皮質에서와 마찬가지로 四君子湯을 처리한 경우 유의하게 감소하였으며, MDA 함량 역시 四君子湯을 처리한 경우 유의하게 감소하였다. 그러므로 腎皮質 切片에서와 마찬가지로 細胞의 손상과 脂質의 過酸化가 四君子湯에 의해 감소됨을 알 수 있다 (Fig. 9, 10).

위와 같이 시험관내 실험을 통하여 四君子湯이 好中球로부터의 활성 산소종의 생성 억제를 확인하였고, 酸化劑로부터의 腎皮質 및 肝組織에서의 細胞 손상과 脂質의 過酸化를 방지하고 있음을 확인하였다. 이는 四君子湯이 활성 산소종을 직접 제거하는 작용을 가짐으로써 2 차적으로 脂質의 過酸化 및 그로 인한 細胞 손상을 방지하거나, 활성 산소종을 직접 제거하지 않더라도 細胞 내에 존재하는 內在性 抗酸化 효소나 물질들의 활성이나 농도를 증가시켜 細胞의 손상을 방지할 가능성이 있음을 示唆한다.

이에 생체 실험을 통해 그 가능성을 확인하기 위하여 HgCl₂ 및 CCl₄를 이용하여 급성 腎組織 및 肝組織 손상을 유발하였으며 이에 대한 四君子湯의 효과를 관찰하였다 (Table 4, 5).

水銀은 환경 오염 물질 중의 하나로 살균제·약품·화장품 등의 제조에 사용될 뿐만 아니라 치과용 재료로 많이 사용되고 있으며 이의 腎臟 및 神經에서의 독성에 대해 연구된 모든 포유류에 대해서 면역병리학적인 장애를 가져오는 것으로 알려져 있다³¹⁻³³. 생체가 水銀에 노출되면 腎臟에 가장 많이 축적되며 두 번째가 肝臟이며 이 외에 腸管·皮膚·脾臟·辜丸 등에 축적되는데³³, 이러한 水銀이 酸化의 인 손상을 주는 과정으로 還元型 glutathione (GSH)을 고갈시키고 미토콘드리아의 H₂O₂ 생산과 脂質의 過酸化를 증가시키게 된다³⁴⁻³⁶. 따라서 水銀은 sulfhydryl기와의 높은 친화성으로 인해 이와 결합하여 이들 효소의 기능을 저해시키고 궁극적으로 細胞의 대사 및 기능이 장애를 받으며 흰 쥐와 생쥐의 腎臟에서 GSH로 인해 세노관에서의 흡수가 증가되는 것으로 보고되고 있다^{36, 37}.

그러므로 HgCl₂에 의해 유발된 급성 腎組織 손상을 유발한 실험 동물에 四君子湯을 투여함으로써 腎臟의 손상 정도가 억제된다면 四君子湯이 抗酸化 효소나 抗酸化劑의 활성이나 농도를 증가시키는 것으로 추정할 수 있다.

HgCl₂에 의한 급성 腎組織 손상을 유발시키기 위해 생쥐를 정상군·대조군 및 실험군으로 나누어 대조군과 실험군에 HgCl₂를 5 mg/kg body weight 되도록 피하 주사하였으며 실험군에만 四君子湯 추출물 2 g/kg body weight/day 로 7 일간 투여하였다. 그리고 생체 내에서의 변화를 살피기 위해 腹部 大靜脈으로부터 혈액을 채취하여 이로부터 얻은 혈청으로 creatinine·BUN·AST·ALT·total protein 및 glucose를 측정하였으며, 腎臟과 肝臟을 적출하여 무게를 재어 체중에 대한 백

분율을 계산하였으며, 脂質의 過酸化 정도도 측정하였다.

그 결과, 腎臟의 무게에서는 아무런 변화를 관찰할 수 없었는데 肝臟에서는 정상군에 비해 대조군에서 유의한 증가가 나타났다. 이러한 결과에 대해서는 아직 자세한 연구가 진행된 바 없으며 추측컨대 HgCl₂에 의해 腎組織 손상이 나타나는 과정에서 肝臟에 기능상의 영향을 미쳐 무게에 변화가 수반되었을 가능성이 크며 이에 대해서는 앞으로 연구를 진행해 보아야 할 것으로 생각된다. 脂質의 過酸化에 있어서는 腎皮質 및 肝組織에서 아무런 유의한 변화가 나타나지 않았다. 혈청 중 creatinine 함량에서 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하여 腎機能의 손상이 있었음을 보였으며, 실험군에서는 대조군에 비해 유의하게 감소하여 四君子湯이 腎機能의 손상을 방지하는 효과가 있음을 보였다. 혈청 중 BUN 함량에서 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으며, 실험군에서는 변화가 나타나지 않았다. 혈청 중 TP 함량의 변화는 유의하지 않았으며, glucose 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 감소하였다. 하지만 실험군에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. 혈청 중 AST 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으며, 실험군에서는 유의한 변화가 없었다. ALT 함량에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 水銀으로 인해 혈청 중 creatinine 및 BUN 함량이 증가되고 glucose 함량이 감소되었으므로 사구체 여과와 세뇨관 재흡수에 장애가 생겨 腎不全이 유발되었고, 四君子湯이 BUN 증가와 glucose의 감소는 억제하지 못했지만 creatinine의 증가는 감소시켰으므로 사구체의 기능이 거의 정상 수준으로 회복되었음을 보였으며, 또한 혈청 중 AST 함량이 水銀으로 인해 증가되었으므로 水銀이 肝臟에 어느 정도의 손상을 줄 수 있음도 나타났다.

CCl₄는 실험 동물에 肝損傷을 유발시키기 위

하여 많이 사용되는 물질로 체내에서 효소에 의해 활성 산소종으로 전환되어 脂質을 過酸化시키는 등의 작용을 통해 肝臟에 손상을 주는 것으로 알려져 있다. 그리고 2 차적으로 활성 산소종으로 인해 염증 관련 細胞들이 활성화되고 cytokines를 분비함으로써 好中球를 활성화시키고 유인하는 역할을 하며, 好中球는 다시 스스로 반응성 산소기를 방출함으로써 肝臟은 더욱 손상 받게 된다³⁸⁻⁴³⁾.

급성 肝組織 손상에 대한 四君子湯의 효과를 관찰하기 위하여 생쥐를 정상군·대조군 및 실험군으로 나누어 대조군과 실험군에 CCl₄를 1 ml/kg body weight 되도록 corn oil에 10% 농도로 희석하여 복강 주사한 후 실험군에만 四君子湯 추출물 2 g/kg body weight/day 로 5 일간 투여하였으며, 정상군에는 같은 비율로 복강에 corn oil 만을 주사하였다. 그리고 급성 腎組織 손상 유발 실험에서와 마찬가지로 혈청 중 creatinine·BUN·AST·ALT·total protein 및 glucose를 측정하였고, 腎臟과 肝臟의 무게와 脂質의 過酸化 정도를 측정하였다.

그 결과, 정상군에 비해 대조군에서 肝臟 무게에 유의한 증가를 보였으며 四君子湯을 5 일간 투여한 실험군에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다. 이는 CCl₄에 의해 肝臟 기능의 손상이 진행되면서 손상받지 않은 기타의 부위가 손상받은 부위의 기능을 보상하기 위해 조직의 증식이 진행된 결과고 생각되나 정확한 기전은 더욱 연구를 진행하여야 할 것이다. 腎臟 무게의 변화에서는 유의한 변화가 없었다. 그리고 정상군 肝組織에 비해 대조군에서 MDA 함량에 유의한 증가가 나타났으며 실험군에서는 유의한 변화가 없었다. 腎皮質 組織에서는 유의한 변화가 없었다. 그러므로 CCl₄에 의한 肝損傷이 脂質의 過酸化에 의한다는 이전 연구자들의 보고와 본 실험의 결과가 같음을 확인하였으나 이에 대한 四君子湯의 억제 효과는 나타나지 않았다.

혈청 중 AST 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였지만 실험군에서는 유의한 변화가 없었다. ALT 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으며, 실험군에서는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 그러므로 脂質의 酸化와 함께 肝機能에 손상이 있었으며, 四君子湯 투여로 혈청 중 ALT 함량이 감소하였으므로 肝臟의 손상에 대한 억제 효과가 있음을 보였다. 혈청 중 creatinine 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으며, 四君子湯을 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. BUN 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으며, 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. TP 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으며, 실험군에서는 유의한 변화가 나타나지 않았고, glucose 함량은 유의한 변화가 없었다.

위의 결과에서 CCl₄로 인해 肝損傷이 유발되었고 이에 대한 四君子湯의 억제 효과가 있었으며, 腎臟도 역시 CCl₄로 인해 손상을 받아 사구체 여과에 유의한 변화가 있었으며 이러한 腎臟의 손상에도 四君子湯 투여가 유의한 효과가 있는 것으로 확인되었다.

그러므로 급성 腎組織 및 肝組織 손상을 유발한 생체 실험을 통해 四君子湯이 유의한 치료 효과가 있음을 알 수 있으므로 이러한 四君子湯의 효능을 시험관내 실험을 통해 밝혀진 바와 같이 직접적으로 반응성 산소기의 발생을 억제할 수도 있을 뿐 아니라 체내에 존재하는 抗酸化 효소와 抗酸化劑의 활성이나 농도를 높여줌으로써 질병의 진행을 억제할 수 있음도 추정해볼 수 있으며 이에 대한 자세한 기전은 앞으로 연구를 더 진행해 보아야 밝혀질 것으로 생각된다.

結 論

韓醫學에서 노화 진행과 질병 발생의 원인 중 하나로 인식되고 있는 氣虛證이 서양의학에서의 활성 산소종 과잉 생성과 관련이 있는지를 관찰하기 위해 四君子湯의 항산화 효과를 조사한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 四君子湯의 표준화는 甘草의 주요 구성 성분인 glycyrrhizine을 이용하는 것이 간편할 것으로 생각된다.

2. 四君子湯은 1 mM t-BHP에 의한 토끼 好中球에서의 활성 산소종 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.

3. 四君子湯은 t-BHP를 1 mM, 10 mM 및 100 mM 농도로 처리한 흰 쥐의 腎皮質 切片에서 細胞 損傷과 脂質 過酸化를 억제하였으며, 肝組織 切片에서는 細胞의 損傷을 억제하지는 못하였으나 脂質의 過酸化는 감소되었다.

4. 四君子湯은 50 mM 농도의 H₂O₂를 처리한 흰 쥐의 腎皮質 및 肝組織 切片에서 細胞 손상과 脂質 過酸化를 억제하였다.

5. 四君子湯은 생쥐를 이용한 생체 실험에서 HgCl₂에 의한 급성 腎組織 손상을 억제하였다.

6. 四君子湯은 CCl₄에 의한 생쥐의 肝組織 손상 뿐만 아니라 腎臟의 손상도 억제하였다.

이상의 결과로 四君子湯의 항산화 효과를 검증하였으며, 氣虛가 활성 산소종 과잉 생성과 연관함을 확인하였다.

參考文獻

1. 陳師文 等編. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社. 1975: 115.
2. 成輔社 編譯. 天眞處方解說. 서울: 成輔社. 1987: 38.
3. 索延昌. 虛證論. 北京: 人民衛生出版社. 1997: 11.
4. 洪元植 校合編纂. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究院. 1985: 11~13, 23~28, 233~

- 235.
5. 洪元植 校合編纂. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究院. 1985 : 241.
 6. 신물질탐색연구회 편저. 신물질탐색. 서울 : 自由아카데미. 1996 : 312, 313, 317, 325, 340.
 7. Hall E. D., Braughler J. M., Yonkers P. A., Smith S. L., Linseman K. L., Means E. D., Scherch H. M., Von Voigtlander P. F., Lahti R. A., Jacobsen E. J. U-78517F: a potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*. 1991 : Aug, 258 (2) : 688~694.
 8. Wakeyama, H., Takeshige, K., Takayanagi, R. and Minakami, S. Superoxide forming NADPH-oxidase preparation of pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. J.*. 1980 : 205 : 593.
 9. Uchiyama M. and Mihara M.. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*. 1987 ; Vol. 86 : 271~278.
 10. 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.*. 1976 ; Vol. 72, 1976 : 248~524.
 11. 辛民教. 臨床本草學. 서울 : 永林社. 1997 : 172, 179, 188, 649.
 12. 珍奇. 中藥名方藥理與應用. 台北 : 南天書局. 1993 : 247.
 13. Harman D.. The Biologic clock: the mitochondria? *J. Amer. Geriatr. Soc.*. 1972 ; 20, 145.
 14. Barja G., Cadenas S., Rojas C. (et al.) Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Rad. Res.*. 1994 : 21 : 317.
 15. Sohal R. S. and Weindruch R.. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996 ; 273 : 59.
 16. Yu B. P.. Aging and oxidative stress : modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.*. 1996 ; 21 : 651.
 17. Farber J. L., Kyle M. E. and Coleman J. B. Biology of disease : Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.*. 1990 ; 62 : 670~679.
 18. Babior B. M.. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.*. 1984 ; 73 : 599.
 19. Rossi F.. The O₂⁻ forming NADPH-oxidase of the phagocytes: nature, mechanism of activation and function. *Biochem. Biophys. Acta.*. 1986 ; 853 : 659.
 20. 윤석환, 정병선. 호중구의 Superoxide생성 Oxidase의 활성화에 대한 연구. *釜山醫大學術誌*. 1989 ; 第29卷, 第1號.
 21. Packer L.. Oxygen Radicals in Biological System. *Methods in Enzymology*. 1984 ; Vol 105. Academic Press. 358.
 22. 金永坤, 金永杓. 프리라디칼. 서울 : 麗文閣. 1997 : 2, 81, 82, 240.
 23. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 1995 : 33, 34, 39, 40.
 24. Stanley L. Robbins, Vinay Kumar. Basic Pathology. W.B. Saunders Company. 1987 : 7.
 25. Sies H.. Biochemistry of oxidant stress. *Angew. Chem. Int. Ed.*. 1986 ; 25 : 1058~1071.
 26. Chance B., Sies H. and Boveris A.. Hydroperoxide metabolism un mammalian

- organs. *Physiol. Rev.* 1979 ; 59 : 527~605.
27. Arstila A. U., Smith M. A. and Trump B. F.. Microsomal lipid peroxidation: Morphological characterization. *Science*. 1972 ; 175 : 530~533.
28. Koko K., Kato M., Matsuoka T. and Mustapha A.. Depression of membrane-bound $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.* 1988 ; 254 : C330~C337.
29. Andreoli S. P., McAteer J. A., Seifert S. A. and Kempson S. A.. Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK₁ cells. Mechanisms of injury. *Am. J. Physiol.* 1993 ; 265 : F337~F384.
30. Di Giulio A., Saletti A., Oratore A., et al.. Monitoring by cis-parinaric fluorescence of free radical induced lipid peroxidation in aqueous liposome suspensions. *J. Microencapsul.* 1996 ; 13 (4) : 435~445.
31. Druet P., Hirsch F., Pelletier L., et al.. Mechanism of chemical-induced glomerulonephritis. In *Mechanisms of Cell Injury : Implications for Human Health* (B. A. Fowler, Ed.). 1987 ; 153~209. John Wiley, New York.
32. Enestrom S., and Hultman P.. Does amalgam affect the immune system? A controversial issue. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995 ; 106 : 180~203.
33. Griem P., Scholz E., Turfeld M. et al.. Strain Differences in Tissue Concentrations of Mercury in Inbred Mice Treated with Mercuric Chloride. *Toxicol. and applied Pharmacol.* 1997 ; 144 : 163~170.
34. Gstraunthaler G., Pfaller W. and Kotanko P.. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem. Pharmacol.* 1983 ; 32 : 2969~2972.
35. Lund B. O., Miller D. M. and Woods J. S.. Studies on Hg(II)-induced H_2O_2 formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 1993 ; 45 : 2017~2024.
36. Tanakakagawa T., Suzuki M., Naganuma A., et al. Strain Difference in Sensitivity of Mice to Renal Toxicity of Inorganic Mercury. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 1998 ; V.285 N.1 : 335~341.
37. 조맹행. 기초 독성학. 서울 : 英志文化社. 1995 : 255, 256.
38. Ip S. P., Ko K. M.. The Crucial Antioxidant Action of Schisandrin B in Protecting Against Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity in Mice : A Comparative Study with Butylated Hydroxytoluene. *Biochemical Pharmacology*. 1996 ; V.52 : 1687~1693.
39. Hase K., Ohsugi M., Xiong Q. B.. Hepatoprotective Effect of Hovenia Dulcis THUNB. on Experimental Liver Injuries Induced by Carbon Tetrachloride or D-Galactosamine/Lipopolysaccharide. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1997 ; V.20 N.4 : 381~385.
40. Sanzgiri U. Y., Srivatsan V., Muralidhara S.. Uptake, Distribution, and Elimination of Carbon Tetrachloride in Rat Tissues Following Inhalation and

Ingestion Exposures. Toxicology & Applied Pharmacology. 1997 ; V.143 : 120~129.

41. Dezwart L. L., Hermanns R. C. A., Meerman J. H. N. Evaluation of Urinary Biomarkers for Radical-Induced Liver Damage in Rats Treated with Carbon Tetrachloride. Toxicology & Applied Pharmacology. 1998 ; V. 148 : 71~82.

42. Louis H., Van Laethem J. L., Wu W., et al.. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and

liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. Hepatology. 1998 ; V. 28 N. 6 : 1607~1615.

43. Yasuda S., Watanabe S., Kobayashi T. Effects of dietary unsaturated fatty acid and chronic carbon tetrachloride treatment on the accumulation of oxidation products, alpha-tocopherol and liver injury in mice. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 1998 ; V. 21 N. 10 : 1050~1056.